АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVII. ВЫП. 1

ЯНВАРЬ — ФЕВРАЛЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1948

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор академик Б. Л. Исаченко

Зам. редактора чл.-корр. Академии Наук СССР
А. А. Имшенецкий

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков,
Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакции журнала „Микробиология"

АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVII

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1948

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКОЛОГИИ ГРИБОВ, ОБРАЗУЮЩИХ АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА. I.

В. Я. Частухин и *М. А. Николаевская*

В одной из своих работ, посвященной антибиотикам, Waksman [3] вполне справедливо указал, что до последнего времени изыскания в этой области носили случайный характер,— изучались культуры, обнаружившие антибиотические свойства при спонтанных заражениях, или коллекционные культуры, имевшиеся в различных лабораториях. Такой подход вполне понятен, если учесть относительную новизну всей проблемы. Однако здесь естественно возникает вопрос, что же представляют собой антибиотические вещества, появляющиеся в культурах различных микроорганизмов. С химической точки зрения этот вопрос уже детально изучается, чего, однако, нельзя сказать об изучении антибиотических веществ с биологической или, вернее, экологической точки зрения. Между тем этот вопрос важен не менее, чем понимание химической стороны воздействия антибиотических веществ на микроорганизм. Для плодотворных дальнейших изысканий в этой области важно знать, почему образуются антибиотические вещества, связано ли их появление с условиями существования того или иного организма или это явление случайное, не обусловленное самой сущностью биодинамических взаимоотношений сложных микробных комплексов, развивающихся в природных условиях.

В такой трактовке вопрос переносится в область экологии и биологии различных микроорганизмов. Здесь, в первую очередь приходится столкнуться с явлениями взаимной конкуренции и борьбы микроорганизмов за овладение субстратом. Эти явления в достаточной мере подробно изучены по отношению к высшим зеленым аутотрофам, где возникновение отдельных растительных ассоциаций и их сукцессия в зависимости от изменяющихся экологических условий изучены довольно хорошо; несомненно, такие же явления происходят и среди низших организмов; здесь, однако, смена одних микробных комплексов другими изучена еще весьма поверхностно. Если задаться вопросом, почему получает перевес та или иная микробная группировка в данной среде, то большей частью трудно получить исчерпывающий ответ, хотя в некоторых случаях такой ответ возможен.

Приведем важнейшие факторы, обусловливающие появление тех или иных микробных ассоциаций.

В первую очередь здесь надо указать на химическую природу разрушающегося вещества. Органические соединения, образовавшиеся в телах животных и растений, подвергаются весьма быстро разрушению присутствующей повсеместно флорой микроорганизмов, как только прекращается действие защитного аппарата животного организма вследствие его смерти или других причин. Состав микрофлоры, вызывающей постепенную минерализацию органических веществ, в значительной мере зависит от их химического состава. Совершенно очевидно, например, что микроорганизмы, вызывающие распад белков в природных условиях, существенно отличаются от микробов, вызывающих распад клетчатки или лигнина.

Одни и те же вещества разлагаются различной флорой в зависимости от окружающих условий. Например, процесс распада древесины в глубине леса протекает совершенно иначе, чем на открытом, сухом месте. Здесь сказывается второй важный фактор, обусловливающий развитие микрофлоры, а именно — влияние экологических условий.

Этим вопрос не исчерпывается: даже в одних и тех же условиях вещества одного и того же химического состава могут быть заселены различной флорой микроорганизмов, в зависимости от характера обсеменения. Кроме всех перечисленных факторов, прямые наблюдения в природе показывают, что при прочих равных условиях, в конечном итоге, решающую роль играет природа самих микроорганизмов, вступающих во взаимную конкуренцию. Перевес получают те формы, которые способны в данных условиях наилучшим образом использовать субстрат и задержать развитие своих конкурентов. Способность к использованию субстрата зависит от биохимической природы грибов, от их способности к выделению ферментов и т. д. Воздействие же на конкурентов в основном зависит от образования различных веществ, препятствующих развитию других микроорганизмов. В самом широком смысле слова, все вещества, обладающие этим свойством, заслуживают названия антибиотических. В дальнейшем изложении, однако, мы ограничиваем это понятие, считая антибиотическими только такие вещества, которые образуются специально для воздействия на другие организмы. В таком толковании органические кислоты, спирты и другие соединения, образующиеся в качестве продуктов обмена, не рассматриваются как антибиотики, хотя они могут оказать весьма существенное влияние на конкурирующую флору.

Характерным признаком антибиотических веществ надо считать их специфическое ядовитое действие на микроорганизмы в чрезвычайно высоких разведениях.

Основная задача наших исследований и заключалась в определении тех природных условий, в которых появляются микроорганизмы, образующие антибиотики. Все исследование построено нами на изучении естественных природных ассоциаций, а не на сопоставлении отдельных систематических групп, как это делалось большей частью до сих пор.

Такое исследование предполагает известное знакомство с условиями появления и сукцессией микробных комплексов в природе. Необходимо иметь возможно полную характеристику той обстановки, в которой развиваются изучаемые микроорганизмы, так как указания типа гербарных этикеток о нахождении того или иного вида в лесу, поле и т. д. совершенно недостаточны для понимания сущности явлений и, в силу необходимости, сводят всю работу на путь чистой эмпирики. Если учесть колоссальное количество грибов, описанных до последнего времени (более 60 тысяч видов), а также возможность значительных физиологических вариаций у отдельных видов, то станет совершенно очевидным необходимость внесения известной системы во все исследование. Это может быть сделано лучше всего, с нашей точки зрения, путем анализа ассоциации микробов, встречающихся в природе.

Приведенные ниже данные получены в результате исследования способности к образованию антибиотических веществ у грибов, выделенных из различных растительных остатков в хвойных лесах. Аналогичные исследования проводятся нами в лиственных лесах и степях и будут опубликованы в дальнейшем.

Для леса можно наметить два основных типа органических веществ, накопляющихся в массовых количествах на поверхности земли, а именно: 1) древесина и 2) лесная подстилка. Постепенная минерализация растительных остатков в лесах реализуется благодаря развитию весьма специфической флоры микроорганизмов. Весь процесс распадается на

ряд фаз или стадий в связи с химическими изменениями субстрата. Приводим здесь краткое описание этих процессов на основании ряда работ, проведенных нами в хвойных лесах средней полосы СССР [1, 2].

Древесина. Для древесины можно нарисовать в общих чертах следующую картину: после гибели дерева или отдельных его ветвей немедленно начинается процесс разрушения отмерших частей благодаря развитию различных микроорганизмов. Процесс этот находится в полной зависимости от химического состава разлагающихся материалов, от условий температуры, влажности и других факторов, характеризующих экологическую обстановку.

По своему химическому составу древесина представляет собой весьма сложную комбинацию различных веществ. Кроме основного лигноцеллюлезного скелета, образующего клеточные стенки, здесь присутствуют еще разнообразные углеводы, начиная с простейших сахаров и кончая сложными запасными полисахаридами вроде крахмала, декстрина и т. д. Затем идет целый ряд белковых соединений и их дериватов, жиры и другие вещества, характерные для живых растительных клеток. Все эти вещества после гибели дерева подвергаются быстрому разрушению благодаря жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов.

Запасные питательные вещества, простейшие сахара и другие доступные обычным сапрофитам соединения подвергаются разрушению в первую очередь различными аскомицетами, вызывающими окраску древесины (синева), а также некоторыми несовершенными грибами вроде Fusarium и др. Эти вещества вполне доступны и для бактериальной флоры, которая, как показали наши исследования, представлена здесь преимущественно грамотрицательными неспоровыми палочками из группы Achromobacter. Так как грибы, обусловливающие эту первую фазу распада, не способны к расщеплению стойких лигно-целлюлезных комплексов, составляющих главную массу древесины, то они и погибают, как только будут использованы все легко разлагающиеся соединения, находящиеся в древесине.

Вторая фаза распада древесины характеризуется развитием основных дереворазрушающих грибов, разлагающих стойкие вещества клеточных стенок древесины. Сложные полисахариды, входящие в состав клеточных стенок, не могут быть непосредственно восприняты мицелием грибов, они должны быть предварительно расщеплены при помощи ферментов. Так как весь процесс протекает экстрацеллюлярно в условиях нестерильной среды, то, очевидно, имеются все условия для развития обычной бактериальной флоры на продуктах распада древесины. Появление такой флоры естественно должно было бы задержать развитие дереворазрушающих грибов. Наши наблюдения показывают, что в природных условиях бактериальная флора на второй фазе распада древесины совершенно не развивается, благодаря выделению мицелием дереворазрушающих грибов веществ, препятствующих развитию бактерий. Представлялось весьма интересным выяснить, играют ли какую-либо роль в этом случае вещества типа антибиотиков.

Продолжительность второй стадии, обусловленной главным образом развитием грибов из сем. Polyporaceae, растягивается на срок от 1 года до 10 лет, в зависимости от условий увлажнения и других факторов.

Третья фаза распада древесины реализуется в основном различными шляпными формами, главным образом из семейства Agaricineae, на долю которых приходится разрушение наиболее стойких соединений древесины, остающихся после грибов, осуществляющих вторую фазу распада. Процесс этот протекает очень медленно и растягивается в зависимости от окружающих условий и видов грибов, принимающих в нем участие, на много десятков лет. Характерным признаком третьей

фазы распада надо считать наличие больших масс отмершего мицелия грибов. Этот мицелий богат органическими соединениями и представляет собой субстрат, пригодный для развития бактерий, которые и были нами обнаружены при изучении состава микроорганизмов, развивающихся в этой стадии. Флора бактерий представлена преимущественно неспоровыми формами из рода Achromobacter и Pseudomonas и в небольшом количестве споровыми палочками. Общее количество бактерий выражается здесь в сотнях тысяч на 1 г сухого вещества.

Подстилка. Химический состав подстилки значительно сложнее, чем состав древесины, так как в подстилку попадают чрезвычайно разнообразные растительные остатки: цветы, плоды, корни, остатки травянистых растений, куски древесины, ветви, а также хвоя и листва деревьев. Несмотря на такое разнообразие веществ, попадающих в подстилку, основной фон всему процессу дает, конечно, опад — лиственный или хвойный. Разложение всех остальных элементов играет здесь второстепенную роль. Для хвойных подстилок в общих чертах процесс можно охарактеризовать следующим образом: хвоя, попадающая в подстилку, богата легко разлагающимися органическими веществами. Вещества эти подвергаются быстрому распаду благодаря жизнедеятельности различных бактерий (главным образом гнилостных форм), а также некоторых видов плесневых грибов.

Основной процесс расщепления стойких лигно-целлюлезных соединений хвои реализуется различными шляпными базидиомицетами и рядом микроскопических сумчатых грибов. Характерным отличием процесса распада хвойной подстилки от процесса распада древесины можно считать: 1) постоянное присутствие в довольно большом количестве бактерий в подстилке (главным образом, гнилостных форм; общее их количество определяется миллиардами или миллионами в 1 г сухого вещества); 2) развитие сумчатых и шляпных грибов, реализующих основную фазу распада вместо Polyporaceae с твердыми карпофорами, как это имеет место при разложении древесины. Что касается бактериальной флоры, то здесь интересно отметить, что конечные фазы распада подстилки сопровождаются появлением ряда грамположительных форм бактерий, в то время как на первом этапе разложения доминируют неспоровые грамотрицательные формы (Flavobacterium, Achromobacter, Pseudomonas).

Экспериментальная часть

Для определения антибиотических свойств растворов, полученных из культур различных микроорганизмов, предложен целый ряд методов (метод разведения, метод цилиндров, метод блоков и, наконец, метод комплексных посевов Ваксмана). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и свои недостатки, но, в конечном итоге, любой из них может быть применен для изучения антибиотических свойств имеющихся культур микроорганизмов.

Мы применили наиболее простой метод, легко доступный в полевой обстановке. В основном мы пользовались методикой определения антибиотиков на жидких средах. Чистые культуры грибов выращивались нами на жидкой среде Чапек — Докса с добавлением дрожжевого автолизата. Питательная среда разливалась в колбы Эрленмейера емкостью 250—300 см^3 с таким расчетом, чтобы высота слоя жидкости не превышала 2 см.

После засева колбы помещались в термостат при 25—30°. Образование пленок грибов на жидкости происходит с различной скоростью, в зависимости от физиологических особенностей изучаемых видов, поэтому исследование культуральной жидкости проводилось нами в различные

сроки от 10 дней до 2 месяцев. Антибиотические свойства изучались по отношению к золотистому стафилококку, кишечной палочке и некоторым сапрофитным формам, характерным для тех субстратов, из которых грибы были выделены. Из этой группы нами были взяты две культуры грамотрицательной палочки из рода Achromobacter и Pseudomonas и одна грамположительная палочка типа Bac. vulgatus. Конечно, было бы интересно поставить более широкое испытание различных групп патогенных и сапрофитных бактерий, что мы и предполагаем сделать в дальнейшем; в настоящий же момент, по чисто техническим причинам, мы вынуждены были ограничиться указанными видами. Для испытания культуральной жидкости на присутствие антибиотика в пробирки, содержащие 5 $см^3$ сахарного бульона, добавлялось 0,1 испытуемой нативной жидкости и 0,1 бактериальной взвеси, содержащей 150 млн. микробных тел в 1 $см^3$. Отметка проводилась через 18 часов инкубации. В тех случаях, где было установлено наличие антибиотических веществ, производилось определение их активности методом серийных разведений, а также кольцевым методом.

Микрофлора древесины (сосна и ель)

Из грибов первой стадии разложения древесины нами были исследованы следующие виды: Cladosporium herbarum — вид, широко распространенный на травянистой растительности, Alternaria humicola, встречающаяся также часто на древесине, Fusarium roseum и Trichothecium roseum — виды, встречающиеся в древесине значительно реже и вызывающие розовое окрашивание, и, наконец, Penicillium aureo — limbum, выделенный нами из пожелтевшей части древесины сосны. Надо сказать, что вообще флора грибов, вызывающих окраску древесины, довольно разнообразна; нами проведено исследование только некоторых наиболее обычных видов. Результаты исследования показали, что антибиотических веществ по отношению к испытанным нами видам бактерий грибы первой фазы распада древесины не образуют.

Вторая фаза характеризуется мощным развитием основных дереворазрушающих грибов. Видовой состав этих грибов различен и зависит от породы дерева и от общих экологических условий. Нами было проведено испытание антибиотических свойств одного из наиболее распространенных в наших лесах разрушителя древесины хвойных Fomes pinicola и сопровождающей его флоры, состоящей главным образом из различных видов Penicillium (Pen. spinulosum, Pen. matris-meae, Pen. fusco-glaucum, Pen. brunneo-rubrum, Pen. rubrum, Pen. columnare). Из дереворазрушающих форм, которые развиваются исключительно на лиственных породах, был испытан Polyporus betulinus. Fomes pinicola резко снижает реакцию среды до pH = 2. Причиной снижения является выделение мицелием этого гриба значительных количеств органических кислот. То же самое происходит и при развитии Fomes pinicola в древесине. Проведенные нами опыты показали, что дереворазрушающие грибы и их спутники в основном не образуют антибиотических веществ. Исключение представляет только один штамм Pen. columnare, у которого было отмечено антибиотическое действие на 20-й день культуры по отношению к золотистому стафилококку. Активность этого штамма была очень незначительная (1—3 единицы Флори).

Третья фаза характеризуется отмиранием мицелия основных разрушителей древесины, сдвигом реакции в сторону щелочности и появлением ряда новых видов грибов и бактерий. Из грибов этой фазы нами были исследованы ряд видов Penicillium: Pen. puberulum, Pen. affinis, Pen. granulatum, Pen. frequentans, Pen. namylovskii. Затем несколько видов Haplographium: Hapl. delicatum, Hapl. bicolor и, наконец, Thieghemella Thieghemii.

Все перечисленные грибы являются наиболее обычными и характерными видами, развивающимися в последней стадии распада древесины. В результате проведенных опытов оказалось, что только у одного вида Penicillium, а именно Pen. namylovskii, можно было констатировать образование пенициллина; активность культуры была незначительна и не превышала нескольких единиц Флори.

На основании описанных выше опытов с микрофлорой, вызывающей распад древесины, можно видеть, что, несмотря на большое разнообразие грибов, принимающих участие в процессе дезинтеграции древесных остатков, активных образователей антибиотических веществ в этих условиях не наблюдается.

Микрофлора подстилки

Распад подстилки так же, как и распад древесины, можно разделить на ряд фаз. Из первой фазы были исследованы: Cladosporium herbarum, Dicoccum asperum, Mucor Ramannianus и Thieghemella Thieghemii. Испытанные виды грибов в наших опытах антибиотических веществ не давали.

Из второй стадии распада подстилки, реализуемой шляпными грибами и рядом плесневых форм, нами было выделено несколько штаммов Pen. notatum с резко выраженными антибиотическими свойствами (культуры шляпных грибов не испытывались, так как методика массовых культур мицелия Agaricineae до сих пор не разработана).

Данные по испытанию активности выделенных культур представлены в таблице. Как видно из таблицы, количество антибиотических веществ на жидкой среде Чапек — Докса у культуры № 361 достигало 35 оксф. единиц, у культуры № 362 составляло 26 единиц и, наконец, культура № 363, наименее активная, давала до 13 единиц Флори.

Таблица

Испытание активности штаммов Penicillium notatum, выделенных из хвойной подстилки

(активность в оксфордских единицах)

№ культуры		Время в сутках				
		4	6	8	9	13
361	Активность	2,5	10	20	35	24
	pH	4,8	6,5	7,3	7,1	8,2
362	Активность	4,5	7,0	13	26	24
	pH	4,9	6,5	6,8	7,7	8
363	Активность	0	1	5	13	12
	pH	4,7	5,8	7,0	8,4	8,7

Примечание. Проверка активности культур проводилась кольцевым методом в лаборатории биоактивных веществ Научно-исследовательского химико-фармацевтического института доктором Уткиным.

Приведенные данные показывают, что в микробных ассоциациях хвойных лесов явления антагонизма между грибами и бактериями наблюдаются только в известных условиях.

В разлагающейся древесине мощным фактором в борьбе за овладение субстратом является способность грибов к выделению органических кислот, препятствующих развитию бактерий.

Грибы, обладающие активными антибиотическими свойствами, здесь не были обнаружены.

В подстилке же, как показали наши наблюдения, присутствуют виды грибов, образующих антибиотики.

Нахождение этих форм в природе связано с развитием определенной бактериальной флоры. В первой стадии распада, где присутствуют преимущественно грамнегативные формы бактерий, мы не находим грибов, образующих антибиотики типа пенициллина.

Появление их во второй фазе распада подстилки совпадает с развитием грамположительных бациллярных форм. Эти наблюдения подтверждают высказанное рядом исследователей предположение, что антибиотические вещества вырабатываются в результате борьбы за существование в процессе естественного отбора. Наследственно это качество закрепляется только у ограниченного числа видов, к которым относятся и некоторые виды Penicillium.

С этой точки зрения становится понятным нахождение таких форм в экологических условиях, где наиболее резко выражены конкурентные взаимоотношения между различными группами микроорганизмов, какими являются грибы и бактерии. Сопоставление общего количества бактерий с активностью выделенных штаммов грибов-антагонистов в наших опытах указывает на существование взаимосвязи между этими двумя факторами.

Высказываясь таким образом, мы, конечно, не считаем вопрос о природе антибиотических веществ разрешенным в какой-либо степени окончательно. Здесь необходимы дальнейшие исследования в разнообразных экологических условиях, а также специальные физиологические эксперименты.

Выводы

1. Авторами ставится задача выяснить те экологические условия, которые благоприятствуют появлению грибов, образующих антибиотические вещества. В сообщении рассматриваются микробиологические ассоциации хвойных лесов.

2. Изучение микрофлоры, вызывающей дезинтеграцию древесины хвойных деревьев, показало, что ни в одной из фаз распада активных образователей антибиотических веществ не было найдено. Наблюдающееся торможение роста бактерий в основной фазе распада древесины можно объяснить присутствием в субстрате органических кислот, выделяемых дереворазрушающими грибами.

3. При исследовании микрофлоры лесной подстилки на разных этапах распада удалось из более разложившейся ее части выделить ряд штаммов Penicillium notatum с резко выраженными антибиотическими свойствами. Появление этих грибов совпадало с наибольшим развитием в субстрате бактериальной флоры и появлением грампозитивных форм.

4. Таким образом, проведенные исследования в известной мере подтверждают предположение, что виды грибов, образующие антибиотики, встречаются в тех условиях, где наиболее резко выражены конкурентные взаимоотношения между грибами и бактериями.

Лаборатория криптогамии
Воронежского госзаповедника

Получено 14.II.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаевская М. А. и Частухин В. Я. Микрофлора еловой древесины на разных фазах распада. Почвоведение, № 8, стр. 403, 1945.
2. Частухин В. Я. Экологический анализ распада растительных остатков в еловых лесах. Почвоведение, № 2, стр. 102, 1945.
3. Waksman and Horning. Distribution of antagonistig Fungi in nature and their antibiotic action. Mycologia, v. XXXV, No. 1, p. 47, 1943.

ВЛИЯНИЕ КАЛИЯ И МАГНИЯ НА РАЗВИТИЕ RHIZOPUS NIGRICANS И НА ЕГО СПОСОБНОСТЬ К КИСЛОТООБРАЗОВАНИЮ

С. А. Баринова

В предыдущей работе [1] нами обнаружено, что пленки гриба, рост которых тормозился недостатком в питательном растворе азота, фосфора или серы, образуют меньше фумаровой кислоты, чем пленки, выращенные при оптимальном количестве перечисленных веществ.

Настоящая работа является продолжением предыдущей, в ней мы пытались выяснить зависимость образования фумаровой кислоты Rhizopus nigricans от концентрации калия и магния в питательной среде.

Условия проведения опытов и методы анализа указаны в ранее опубликованной работе [1].

В опытах, приведенных в настоящей работе за исключением табл. 5, фумаровая кислота определялась после извлечения эфиром в виде ртутной соли.

1. Влияние калия на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию

Калий в питательную среду дается в виде однозамещенного фосфорнокислого калия, поэтому фосфор в средах с пониженным содержанием калия дополнительно вносился в виде однозамещенного фосфорнокислого натрия или аммония. При внесении фосфорнокислого аммония количество сернокислого аммония соответственно уменьшалось.

Развитие гриба и образование фумаровой кислоты на средах с фосфорнокислым натрием и фосфорнокислым аммонием были одинаковы, поэтому, чтобы не загромождать таблицы, мы приводим опыты, в которых недостаток фосфора пополнялся до его содержания в основной среде фосфорнокислым натрием.

Таблица 1

Влияние калия на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию

(Продолжительность опыта 2 дня)

№ опыта	№ культуры	Концентрация калия в питательной среде в %	Фумаровая кислота		Потреблено глюкозы в г	Выход фумаровой к-ты в % от потребленной глюкозы	Вес гриба	
			в г	в % от основной среды			в г	в % от основной среды
1	1—3	0,0189*	0,485	100,0	3,185	26,7	0,413	100,0
	4—6	0,0038	0,613	126,3	3,017	30,9	0,394	95,3
	7—9	0,0019	0,650	134,0	3,066	33,6	0,361	87,4
1а	1—2	0,0189*	0,489	100,0	3,570	33,9	0,530	100,0
	3—5	0,0019	0,759	155,2	2,555	31,1	0,530	100,0
	6—8	0,00095	0,802	164,6	3,370	49,2	0,299	59,8
	9—10	0,00063	0,621	127,0	3,630	45,3	0,245	49,0

* Основная среда.

Из результатов опытов, представленных в табл. 1, видно, что уменьшение калия в питательном растворе в 5 и 10 раз почти не понижает скорости роста гриба, но тормозит очень сильно образование спор (опыт 1, культуры 4—6 и 7—9). При дальнейшем понижении калия в среде наблюдается уже торможение роста гриба и, одновременно с этим, полное прекращение спорообразования (опыт 1а, культуры 6—8 и 9—10).

В противоположность результатам, полученным в предыдущих опытах с азотом, фосфором и серой, при уменьшении до известного предела калия в питательной среде возрастает способность пленок образовывать фумаровую кислоту на растворах глюкозы.

Наиболее активные пленки получаются на среде с 0,00095% калия, т. е. на среде, содержание калия в которой уменьшено в 20 раз. При дальнейшем снижении калия активность пленок уменьшается, что, по-видимому, обусловлено очень сильным ослаблением развития. Однако и в этом случае активность пленок, отнесенная к единице веса, остается выше, чем на основной среде (опыт 1а, культуры 9—10).

Результаты этих опытов подобны данным Takahashi и Sakaguchi [2], полученным с Rhizopus sp.

2. Влияние магния на развитие Rhizopus nigricans и на образование им кислот

Магний в питательную среду дается в виде сернокислого магния. В среды с уменьшенным содержанием магния, ввиду большого содержания серы в них, не вносится другой соли серной кислоты.

Таблица 2

Влияние магния на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию

(Продолжительность опыта 2 дня)

№ опыта	№ культуры	Концентрация магния в питательной среде в %	Фумаровая кислота		Потреблено глюкозы в г	Выход фумаровой к-ты в % от потребленной глюкозы	Вес гриба	
			в г	в % от основной среды			в г	в % от основной среды
2	1—4	0,0032*	0,576	100,0	2,615	22,0	0,503	100,0
	5—7	0,00064	0,577	100,1	2,257	25,5	0,503	100,0
	8—10	0,00032	0,705	122,3	2,518	27,9	0,509	101,1
2а	1—2	0,0032*	0,551	100,0	2,580	21,3	0,560	100,0
	3—5	0,0001	0,783	142,1	2,370	33,0	0,470	83,9

* Основная среда.

При рассмотрении результатов опытов, сведенных в табл. 2, видно, что магний, подобно калию, в основной питательной среде находится по сравнению с азотом и фосфором в значительном избытке. При уменьшении магния в питательном растворе в 5 и 10 раз рост гриба не уменьшается, но задерживается спорообразование (опыт 2, культуры 5—7, 8—10).

Дальнейшее понижение магния в среде немного понижает рост гриба и полностью останавливает образование спор (опыт 2а, культуры 3—5).

Что касается кислотообразования, то в опытах с магнием обнаружилась зависимость, подобная той, которая наблюдалась и для калия, а именно: при понижении магния в среде повышается способность пленок

образовывать фумаровую кислоту на растворах глюкозы (опыт 2, культуры 8—10 и опыт 2а, культуры 3—5).

На основании данного опыта можно считать, что 0,0001% магния в питательном растворе — есть оптимальная концентрация для выращивания пленок, обладающих наибольшей активностью в отношении образования фумаровой кислоты. Оптимальная концентрация для получения наибольшей биомассы гриба значительно выше, чем первая.

Установленная нами зависимость спорообразования от концентраций калия и магния в питательной среде не может быть объяснена недостатком этих веществ в питательной среде. Известно, что организм при образовании репродуктивных органов мобилизует необходимые для этого вещества из других частей организма. Поэтому в наших опытах недостаток калия или магния должен был отразиться в первую очередь на скорости роста пленки и только потом на образовании спор. Указанная зависимость, повидимому, имеет вторичный характер и обусловлена повышением накопления фумаровой кислоты.

3. Влияние калия и магния на развитие и способность к кислотообразованию Rhizopus nigricans

Предыдущими опытами установлено, что при ограничении роста пленок недостатком в питательном растворе калия или магния повышается активность их в отношении образования фумаровой кислоты.

В настоящем опыте торможение роста пленок вызывалось одновременно недостатком калия и недостатком магния.

Таблица 3

Влияние калия и магния на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию

(Продолжительность опыта 2 дня)

№ культуры	Концентрация в питательной среде		Фумаровая кислота		Потреблено глюкозы в г	Выход фумаровой к-ты в % от потребленной глюкозы	Вес гриба	
	калия	магния	в г	в % от основной среды			в г	в % от основной среды
1—3	0,0189*	0,0032*	0,532	100,0	2,800	19,0	0,537	100,0
4—6	0,00095	0,0001	0,344	64,6	1,800	19,1	0,151	28,1
7—9	0,0189	0,0001	0,602	113,1	2,581	23,3	0,426	79,3
10—12	0,00095	0,0032	0,734	138,0	1,922	38,2	0,233	43,8

* Основная среда.

Результаты этого опыта, представленные в табл. 3, подтверждают данные предыдущих опытов и, кроме того, показывают, что гриб на питательной среде, в которой недостает и калия и магния, развивается значительно медленнее (культуры 4—6), чем на средах с недостаточным количеством одного какого-нибудь вещества (культуры 7—9 и 10—12), и, повидимому, вследствие этого на растворах глюкозы мало образует фумаровой кислоты. Однако уменьшение фумаровой кислоты, вызванное недостатком в среде калия и магния, выражено в меньшей мере, чем понижение в весе пленки.

Известно, что пленки активных культур грибов могут сбраживать последовательно несколько растворов глюкозы, существенно не изменяя при этом скорости процесса. Естественно, и нам необходимо было установить, как долго имеющаяся в нашем распоряжении культура Rhizopus nigricans сохраняет способность образовывать фумаровую кислоту на растворах глюкозы.

Таблица 4

Влияние калия и магния на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию

(Продолжительность опыта 4 дня)

№ культуры	Концентрация в питательной среде в %		Фумаровая кислота		Потреблено глюкозы в г	Выход фумаровой к-ты в % от потребленного сахара	Вес гриба	
	калия	магния	в г	в % от основной среды			в г	в % от основной среды
			1-й раствор глюкозы					
1—2	0,0189	0,0032*	0,768	100,0	3,463	22,1	—	—
3—4	0,00095	0,0032	1,382	179,9	3,921	36,2	—	—
9—10	0,0019	0,0003	1,085	141,2	3,796	28,5	—	—
			2-й раствор глюкозы					
1—2	0,0189	0,0032*	0,536	69,7	2,806	19,1	0,588	100,0
3—4	0,00095	0,0032	1,377	179,3	3,899	35,3	0,350	59,5
4—10	0,0019	0,0003	1,078	140,3	3,564	30,2	0,345	58,6

* Основная среда.

Из опыта, сведенного в табл. 4, видно, что продолжительность сохранения активности гриба зависит от содержания калия и магния в питательной среде. Активность пленок, выращенных на средах с недостатком калия и магния, не понижается при сбраживании 2-го раствора глюкозы.

Следовательно, при ограничении роста пленок недостатком в питательной среде азота, фосфора или серы активность пленок не изменяется, но, вследствие уменьшения их массы, понижается скорость образования фумаровой кислоты и, наоборот, при ограничении роста пленок недостатком калия или магния повышается их активность.

На основании всех проведенных опытов можно вместо основной питательной среды рекомендовать среду следующего состава:

$(NH_4)_2SO_4$ — 0,3%, KH_2PO_4 — 0,0033%, $NaH_2PO_4H_2O$ — 0,06%,
$MgSO_4\ 7H_2O$ — 0,033%, $ZnSO_4\ 7H_2O$ — 0,005% и $FeCl_3$ — 0,003%

как значительно более благоприятную для выращивания активных пленок.

Спирт определялся во всех опытах, но установить какую-либо зависимость образования его от состава питательной среды нам не удалось, так как количество его сильно колебалось в отдельных опытах.

4. Накопление фумаровой кислоты на растворах глюкозы различной концентрации

В этом опыте гриб выращивался на новой питательной среде, состав которой приведен в предыдущем опыте.

Из табл. 5 видно, что образование фумаровой кислоты на 5—10% растворах глюкозы протекает в течение двух дней с одинаковой скоростью. Затем, в связи с потреблением значительного количества глюкозы на 5% растворе сахара накопление кислоты замедляется. Обращают на себя внимание очень низкие выходы фумаровой кислоты на 20%

Таблица 5

Накопление фумаровой кислоты на растворах глюкозы различной концентрации

№ культуры	Концентрация глюкозы в %	Фумаровая кислота		Потреблено глюкозы в г	Выход фумаровой к-ты в % от потребленной глюкозы	Вес гриба	
		в г	в % от основной среды			в г	в % от основной среды
Продолжительность опыта 2 дня							
1—2	5,0	0,709	93,2	1,577	44,0	—	—
3—4	10,0	0,852	100,0	2,315	36,8	—	—
5—6	20,0	0,683	80,1	3,657	18,6	—	—
Продолжительность опыта 4 дня							
1—2	5,0	1,041	64,5	2,316	44,9	0,371	95,8
3—4	10,0	1,613	100,0	3,680	43,3	0,432	100,0
5—6	20,0	1,383	85,7	4,914	28,1	0,525	121,5

растворе глюкозы, в особенности в начале опыта, обусловленные, наверное, значительным приростом пленки.

Некоторые исследователи указывают, что плесневые грибы часто теряют способность образовывать фумаровую кислоту. Мы работали с Rhizopus nigricans относительно долгое время и не наблюдали потери им способности образовывать фумаровую кислоту.

Сравнивая результаты наших опытов с результатами других исследователей, работавших по фумаровокислому брожению, можно сделать вывод, что имеющаяся в нашем распоряжении культура Rhizopus nigricans обладает большой способностью образовывать фумаровую кислоту.

Работа по изысканию оптимальных условий накопления фумаровой кислоты в культурах Rhizopus nigricans продолжается.

Выводы

1. При ограничении роста пленок гриба недостатком калия или магния в питательном растворе повышается их способность образовывать фумаровую кислоту.

2. Образование фумаровой кислоты протекает с наивысшей скоростью на 5—10% растворах глюкозы.

3. На основании опытов, проведенных в предыдущей и в данной работах, можно предложить вместо исходной питательной среды, среду следующего состава:

$(NH_4)_2SO_4$ — 0,3%, KH_2PO_4 — 0,0033%, $NaH_2PO_4H_2O$ — 0,06%, $MgSo_4\,7H_2O$ — 0,033%, $ZnSo_4\,7H_2O$ — 0,005% и $FeCl_8$ — 0,003%

как более благоприятную для выращивания пленок, активных в отношении образования фумаровой кислоты.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 30.IV.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринова С. А. Влияние pH азота, фосфора и серы на развитие Rhizopus nigricans и на его активность к кислотообразованию. Микробиология, т. XVI, стр. 461, 1947.
2. Takahashi T. and Sakaguchi K. On the physiology of Rhizopus sp. The effect of phosphoric acid and potassium for the production of acids and ethyl alcohol. Bull. Agric. Chem. Soc. of Japan., v. 3, p. 39, 1927.

АДАПТАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ. БРОЖЕНИЕ, ВЫЗЫВАЕМОЕ ДРОЖЖАМИ, АДАПТИРОВАННЫМИ К ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Л. Г. Логинова

В настоящее время большое внимание привлекают к себе микроорганизмы, способные развиваться при высоких температурах. Характерной чертой таких микробов является их высокая биохимическая активность [1]. Получение термофильных вариантов в экспериментальных условиях возможно путем адаптации мезофильных форм к высокой температуре. Однако этот процесс протекает довольно медленно и требует большой настойчивости от экспериментатора.

В более ранней работе [2] нами были предприняты попытки экспериментально получить термофильную расу дрожжей Saccharomyces cerevisiae. В результате длительного культивирования при постепенно повышающейся температуре (в течение 6 месяцев) была получена культура дрожжей, развивающихся при температуре 40°.

При изучении физиологических свойств данного варианта оказалось, что он обладал высокой сбраживающей способностью. К сожалению, в 1941 г. эксперименты были прерваны и культура погибла. Эта работа была вновь начата в 1944 г. Пользуясь той же методикой, удалось получить культуру дрожжей Saccharomyces cerevisiae XII расы, хорошо развивающуюся при 40°.

После 18-месячного культивирования вариантов при указанной температуре были изучены их физиологические свойства.

Результаты исследований приведены в настоящей работе.

Экспериментальная часть

Сбраживание углеводов размножающимися клетками

Опыты по адаптации были проведены с дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII расой. Средой для культивирования служило пивное сусло 7° Блг.

Пассажи велись как на жидкой среде в пробирках, так и на плотной среде (сусло-агар). Пересевы производились через каждые два-три дня. Вначале адаптация велась при более низких температурах (32, 34, 36°), затем, по мере приучения дрожжей, культивирование проводилось при более высокой температуре (38, 39, 40°). В качестве контроля служили дрожжи, которые культивировались этот же период времени при температуре 28—30°.

Во время пассажей тщательно следили за цветом налета дрожжей на сусло-агаре, а также производились микроскопические наблюдения. Коричневатый оттенок налета свидетельствовал о вырождении культуры. Методика культивирования дрожжей при высоких температурах детально описана в более ранней работе [2].

В результате длительного культивирования дрожжей при 40° (в течение 18 месяцев) была получена раса дрожжей, развивающаяся при указанной температуре. Для изучения биохимической активности адаптированной расы дрожжей были проведены опыты по сбраживанию углеводов при 40°.

В качестве контроля проводилось сбраживание сусла исходной культурой Saccharomyces cerevisiae при 40° (контроль 1) и при 30° (контроль 2).

Сбраживанию подвергалось 90 мл пивного и мелассного сусла 9—11° Блг. В опыте употреблялась односуточная культура дрожжей, выращенная на сусле 7° Блг. Сброженное сусло осторожно сливалось, и к осадку дрожжей прибавлялась стерильная водопроводная вода. Полученную взвесь дрожжей вносили в опытные колбы в количестве 10% по объему при сбраживании пивного сусла и 25% — в опытах с мелассой.

Колбы закрывались клапанами Мейсля, взвешивались и ставились в термостат на двое суток. При сбраживании мелассы брожение проводилось в течение трех суток. Об интенсивности брожения судили по количеству выделившейся при брожении углекислоты.

В некоторых опытах в конце брожения определялся спирт по методу Мартена и количество несброженных редуцирующих веществ — по методу Бертрана. Общее количество дрожжевых клеток подсчитывалось в камере Тюрка. Процент мертвых клеток учитывался при помощи окраски метиленовой синью.

Чтобы изучить, в какой мере изменяется характер брожения и жизнеспособность дрожжей при дальнейших пересевах, в каждом опыте по окончании брожения одинаковым количеством клеток засевалось свежее сусло.

Результаты опытов сбраживания на пивном и мелассном сусле приведены в таблицах 1, 2 и 3.[1]

Таблица 1

Интенсивность сбраживания пивного сусла дрожжами, адаптированными к температуре 40°

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Пассажи	Количество выделенного CO_2 из 100 мл среды, в г	Клетки, окрашивающиеся метиленовой синью, в %	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды в млн.
1	С 40 на 40°	1	2,70	14,29	31,85
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	2,50	60,48	35,0
	» 30 » 30° 2-й »	1	2,78	1,0	82,20
	» 40 » 40°	2	2,40	13,80	23,00
	» 30 » 40° 1-й контроль	2	1,47	27,20	22,00
	» 30 » 30° 2-й »	2	2,50	0,0	108,93
2	С 40 на 40°	1	2,80	7,56	25,8
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	2,61	28,45	21,18
	» 30 » 30° 2-й »	1	2,96	4,0	62,0

Анализируя полученные данные, мы видим, что адаптированные дрожжи сбраживают при 40° почти так же интенсивно, как обычные дрожжи при 29—30° (контроль 2).

Однако количество дрожжевых клеток в культуре при брожении, проведенном адаптированными дрожжами, примерно вдвое меньше. Так, при обычном брожении образуется в среднем 70,3 млн. дрожжей в 1 мл среды, в то время как при брожении, проведенном при 40°, количество дрожжей значительно меньше, а именно 26,06 млн. в 1 мл среды.

Таким образом, очевидно, что биохимическая активность у этих дрожжей выше.

Повидимому, при длительном культивировании клеток при высокой температуре возникают и селекционируются новые формы, наиболее

[1] Анализы выполнялись совместно с лаборантом К. З. Перовой, за что приношу ей свою благодарность.

устойчивые к измененным условиям. При сбраживании сусла обычными дрожжами (контроль 1) при 40° оказалось, что брожение в первом пассаже проходило почти с той же интенсивностью, как и брожение, проведенное адаптированными дрожжами (таблицы 1, 2 и 3).

Таблица 2

Сбраживание пивного сусла адаптированными дрожжами

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Пассажи	Количество выделенного CO_2 из 100 мл среды, в г	Спирт в 100 мл среды, в г	Клетки, окрашивающиеся метиленовой синью, в %	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды, в млн.
1*	С 40 на 40°	1	—	5,17	20,23	26,90
	» 40 » 30°	1	—	5,28	2,17	116,0
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	—	4,69	78,81	20,55
	» 30 » 30° 2-й »	1	—	5,38	6,25	67,30
**	» 40 » 30°	2	1,84	—	6,25	108,0
	» 30 » 30° 2-й контроль	2	1,80	—	6,70	51,10
2	С 40 на 40°	1	—	4,51	9,56	31,65
	» 40 » 30°	1	—	4,68	1,49	119,0
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	—	3,95	55,60	18,50
	» 30 » 30° 2-й »	1	—	4,63	8,38	76,10
**	» 40 » 40°	2	1,92	—	4,99	23,5
	» 30 » 40° 1-й контроль	2	0,97	—	88,13	14,5
	» 30 » 30° 2-й »	2	2,17	—	2,91	56,3

* В первый день брожения температура поднялась до 45° (держалась ночь).
** Сбраживанию подвергалось сусло более низкого баллинга, чем при сбраживании в первом пассаже.

Таблица 3

Сбраживание мелассы адаптированными дрожжами

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Пассажи	Количество выделенного CO_2 из 100 мл среды, в г	Клетки, окрашивающиеся метиленовой синью, в %	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды, в млн.
1	С 40 на 40°	1	1,59	10,5	40,0
	» 40 » 30°	1	1,40	1,7	74,6
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	1,47	57,2	28,0
	» 30 » 30° 2-й »	1	1,61	0,9	41,0
	» 40 » 40°	2	1,52	11,8	24,40
	» 40 » 30°	2	1,56	2,31	69,0
	» 30 » 40° 1-й контроль	2	0,87	92,90	7,6
	» 30 » 30° 2-й »	2	1,55	4,30	37,4
2	С 40 на 40°	1	1,60	5,8	33,4
	» 40 » 30°	1	1,57	1,2	54,8
	» 30 » 40° 1-й контроль	1	1,57	69,30	18,5
	» 30 » 30° 2-й »	1	1,50	0,61	33,4
	» 40 » 40°	2	1,58	10,6	16,2
	» 40 » 30°	2	1,25	—	41,4
	» 30 » 40° 1-й контроль	2	0,56	100	2,33
	» 30 » 30° 2-й »	2	1,31	6,2	25,70

Однако у дрожжей, не приученных к высокой температуре, в конце брожения процент клеток, окрашенных метиленовой синью, всегда был больше.

При повторном сбраживании исходными дрожжами сусла при 40° мы обнаружили уже значительную разницу в интенсивности брожения. Дрожжи, адаптированные к повышенной температуре, сбраживают среду с прежней интенсивностью, тогда как брожение проведенное не адаптированными дрожжами во 2-м пассаже при 40°, протекает в два раза слабее, а в некоторых случаях (при сбраживании мелассы) совсем приостанавливается (табл. 3, опыт 2). Таким образом, эти опыты показали, что мы имеем расу дрожжей, приученную к высокой температуре.

В дальнейшем были проведены опыты по сбраживанию адаптированными дрожжами углеводов при более низкой температуре (28—30°). Цифровые данные этих опытов представлены в таблицах 2 и 3.

На основании проведенных опытов можно констатировать, что брожение проходит с той же интенсивностью, как и при обычном сбраживании (контроль 2).

Однако количество образовавшихся клеток в конце брожения при 28—30° всегда в полтора-два раза больше, чем в контроле. При высеве этих дрожжей на сусло-агар соответственно образуется большее количество колоний, чем при высеве дрожжей из контроля (табл. 4).

Таблица 4

Размножение адаптированных к повышенной температуре дрожжей при 28—30°

№ опыта	Saccharomyces cerevisiae XII раса	Количество выделенного CO_2 из 100 мл среды, в г	Количество дрожжевых клеток в 1 мл среды, в млн.	Количество колоний, сбразовавшихся на чашках Петри, в млн.
1	С 30 на 30°	3,23	46,3	168,5
	» 40 » 30°	3,02	75,0	287,5
2	» 30 » 30°	2,93	41,15	188,5
	» 40 » 30°	2,87	81,65	472,5
3	» 30 » 30°	3,0	38,6	238,0
	» 40 » 30°	2,98	79,25	439,0
4	» 30 » 30°	2,27	61,35	—
	» 40 » 30°	2,38	91,50	—
5	» 30 » 30°	3,45	69,35	—
	» 40 » 30°	3,32	102,12	—

Это свойство адаптированные дрожжи стойко сохраняют на протяжении многократных пересевов (табл. 5).

К сожалению, дальнейшие наблюдения за интенсивностью размножения дрожжей не проводились.

Микроскопические наблюдения показывают, что как неадаптированные так и адаптированные дрожжи находятся в хорошем состоянии. Это подтверждается тем, что процент клеток, окрашивающихся метиленовой синью, незначителен.

Адаптированные дрожжи при температуре 28—30° несколько мельче по величине. Так, средняя величина обычных дрожжей 9,3—8,56 $\mu \times$ $\times$ 8,36—7,74 μ, в то время как адаптированные дрожжи при температуре 28—30° имеют величину 7,4—7,0 $\mu \times$ 6,68—6,32 μ. Простой математический подсчет показывает, что, приняв во внимание величину дрожжей и количество образовавшихся клеток при брожении, мы получаем большую биомассу при размножении адаптированных дрожжей.

Этот факт несомненно интересен не только в теоретическом отношении, так как увеличение биомассы для дрожжевого производства представляет значительный интерес.

Таблица 5

Интенсивность размножения адаптированных к повышенной температуре дрожжей при многократных пересевах на жидкой среде при температуре 28—30°

Saccharomyces cerevisiae XII раса	Пассажи	Количество выделенного CO_2 из 100 мл среды в г	Количество клеток в 1 мл среды	
			в млн.	в %
С 30 на 30°	1	2,84	44,3	60,8
» 40 » 30°	1	2,65	72,8	100,0
» 30 » 30°	2	2,74	37,1	56,9
» 40 » 30°	2	2,53	65,2	100,0
» 30 » 30°	3	2,95	53,3	54,2
» 40 » 30°	3	2,47	99,0	100,0
» 30 » 30°	4	2,37	36,2	59,5
» 40 » 30°	4	2,21	61,3	100,0

Примечание. При каждом пересеве вносилось равное количество дрожжей.

Зависимость размножения адаптированных дрожжей от различных температур наглядно показана на рис. 1 и табл. 4.

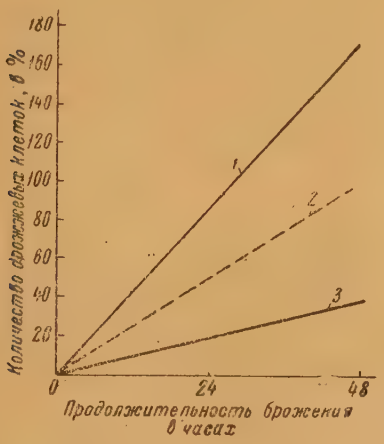


Рис. 1. Размножение адаптированных дрожжей при различных температурах. *1* — с 40 на 30° (опыт); *2* — с 30 на 30° (контроль); *3* — с 40 на 40° (опыт)

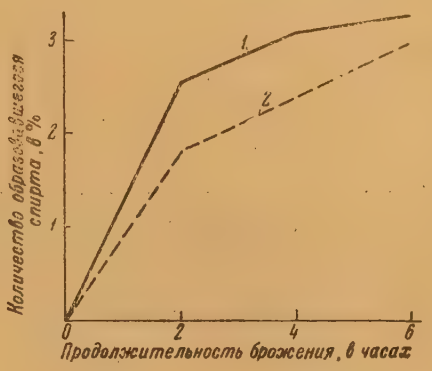


Рис. 2. Сбраживание пивного сусла при повышенной температуре адаптированными дрожжами. Температура опыта 40°,0—40°,5; *1* — с 40 на 40°(опыт) *2* — с 30 на 40° (контроль)

Сбраживание углеводов в кратковременных опытах

В дальнейшем были проведены опыты по сбраживанию углеводов в условиях, по возможности исключающих размножение дрожжей. Для этой цели в среду вносилось большое количество клеток, что давало возможность судить об интенсивности кратковременного брожения.

Методика опытов заключалась в следующем. Дрожжи из односуточной культуры, выращенной на пивном сусле 7° Блг, отфильтровывались, а затем смывались водопроводной водой и отпрессовывались. Брожение проводилось в небольшом объеме среды (10 мл). Часть опытов была проведена на пивном сусле 7° Блг, другая часть — на растворе с 4% глюкозой, приготовленной на фосфатном буффере (pH = 5,5). Дрожжи

вносились в количестве 4% к объему среды. Продолжительность брожения на пивном сусле — 6 часов, на среде с глюкозой — 4,5 часа. Через каждые 2 часа определялось количество образовавшегося спирта и редуцирующие вещества, оставшиеся в среде. Опыты проведены при 40 и 43—44°.

Цифровые данные, полученные при проведении опытов на пивном сусле 7° Блг, показаны в табл. 6.

Таблица 6

Сбраживание пивного сусла 7° Блг дрожжами, адаптированными к высокой температуре (острые опыты)

Saccharomyces cerevisiae XII раса	Длительность брожения в часах	Температура опыта					
		40—40,5°		43°		43—44°	
		спирт в 100 мл среды, в г	не сброженн. редуцир. вещества, в г	спирт в 100 мл среды, в г	не сброженн. редуцир. вещества в 100 мл среды, в г	спирт в 100 мл среды, в г	не сброженн. редуцир. вещества в 100 мл среды, в г
Контроль 1 *	2	1,8	4,47	1,08	5,06	1,39	4,83
Дрожжи, адаптированные к 40°	2	2,51	3,10	1,37	4,72	1,84	4,20
Контроль 1 *	4	2,31	—	1,72	4,59	1,39	4,83
Дрожжи, адаптированные к 40°	4	3,0	—	2,07	4,32	2,65	2,59
Контроль 1 *	6	2,93	2,28	1,87	3,69	1,69	4,03
Дрожжи, адаптированные к 40°	6	3,22	1,80	2,58	2,90	2,65	2,7
		Температура опыта 30°					
Контроль 1 *	6	3,27	1,88	—	—	3,39	1,9

* Дрожжи развиваются при 28—30°.

Мы видим, что дрожжи, адаптированные к высокой температуре, сбраживают среду при 40° в первые 4 часа значительно интенсивнее, чем обычные дрожжи (контроль 1) (табл. 6, рис. 2). Однако к шести часам брожения эта разница уменьшается. Выход продуктов брожения за указанный период времени у испытуемых дрожжей такой же, как и

Таблица 7

Сбраживание синтетической среды с глюкозой дрожжами, адаптированными к высокой температуре

Saccharomyces cerevisiae XII раса	Длительность брожения в часах	Температура опыта					
		40—40,5°	30°	43°	30°	43—44°	30°
		Спирт в 100 мл среды, в г					
Контроль 1*	1,5	—	—	0,97	—	1,09	—
Контроль 2*	1,5	—	1,0	—	1,12	—	0,84
Дрожжи, адаптированные к 40°	1,5	1,0	—	1,38	—	0,84	—
Контроль 1*	3,0	1,6	—	1,71	—	1,61	—
Контроль 2*	3,0	—	1,45	—	1,67	—	1,44
Дрожжи, адаптированные к 40°	3,0	2,0	—	1,67	—	1,42	—
Контроль 1*	4,5	1,91	—	1,66	—	1,52	—
Контроль 2*	4,5	—	2,1	—	1,82	—	1,63
Дрожжи, адаптированные к 40°	4,5	2,0	—	1,93	—	1,84	—

* Дрожжи развиваются при 28—30°.

при обычном брожении, проведенном при 30°. Более высокая температура (43—44°) снижает биохимическую активность как тех, так и других дрожжей (табл. 6, рис. 3). Однако количество образовавшегося спирта у адаптированной расы дрожжей значительно выше, чем у дрож-

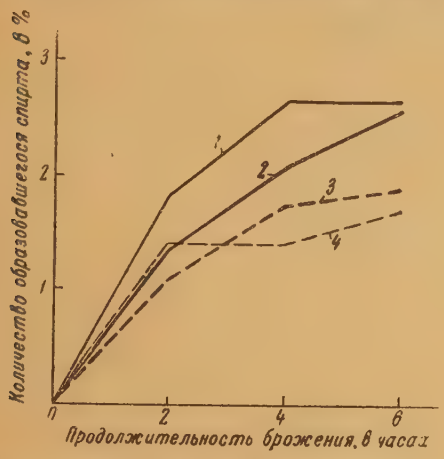


Рис. 3. Сбраживание пивного сусла при повышенной температуре адаптированными дрожжами. Температура опыта 43—44°. *1* — с 40 на 44° (опыт); *2* — с 40 на 43° (опыт); *3* — с 30 на 43° (контроль 1); *4*—с 30—44° (контроль 1)

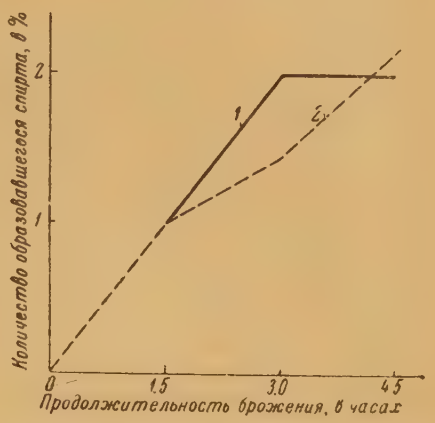


Рис. 4. Сбраживание синтетической среды с глюкозой при повышенной температуре адаптированными дрожжами. *1* — с 40 на 40° (опыт); *2* — с 30 на 30° (контроль 2)

жей обычных (контроль 1), и эта разница сохраняется на протяжении всего брожения.

Довольно близкие результаты были получены при кратковременном сбраживании синтетической среды с глюкозой (табл. 7).

Однако в данном случае, когда совершенно исключен процесс размножения клеток, разница в выходе спирта у испытуемых рас дрожжей менее резкая.

Интересно отметить, что сбраживание среды, проведенное адаптированными дрожжами при 40°, проходит значительно быстрее и почти полностью заканчивается в течение 3 часов, в то время как обычные дрожжи при температуре 28—30° заканчивают брожение только через 4,5 часа (табл. 7, рис. 4). При более высокой температуре (43—44°) адаптированные дрожжи дают такой же выход продуктов брожения, как и при обычном сбраживании при 28—30° (табл. 7, рис. 5). Таким образом, на синтетической среде с глюкозой действие высокой температуры при кратковременных опытах почти не сказывается.

Суммируя данные таблиц 6 и 7, мы приходим к выводу, что при высоких температурах (40—44°) более стойкими являются те формы, которые длительное время культивировались при повышенной температуре.

Обсуждение результатов

Анализируя полученные данные, мы видим, что, постепенно приучая дрожжи к высокой температуре, можно получить расу дрожжей, энергично развивающуюся при 40°.

При сбраживании сусла адаптированными дрожжами в течение 48 часов при 40° выход продуктов брожения был такой же, как при сбраживании углеводов неадаптированными дрожжами при 30°, размножение клеток при этом было задержано (рис. 6). Работая длительное время с термофильными бактериями, Имшенецкий [1] также наблюдал, что термофильные бактерии обладают значительно более высокой био-

химической активностью, хотя при этом количество образовавшихся клеток меньше, чем в культуре мезофильных бактерий.

Такое значительное снижение интенсивности размножения у бактерий при высоких температурах автор объясняет недостатком кислорода в

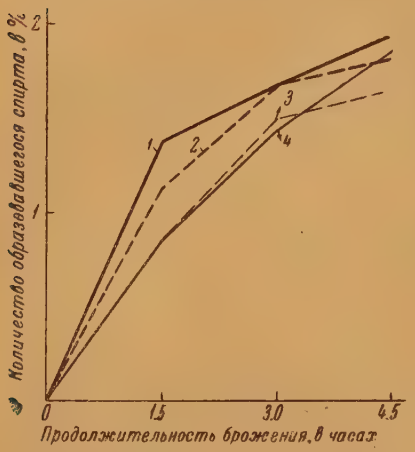


Рис. 5. Сбраживание синтетической среды с глюкозой при повышенной температуре адаптированными дрожжами. *1* — с 40 на 43° (опыт); *2* — с 30 на 30° (контроль 2); *3* — с 30 на 30° (контроль 2); *4* — с 40 на 40—41° (опыт).

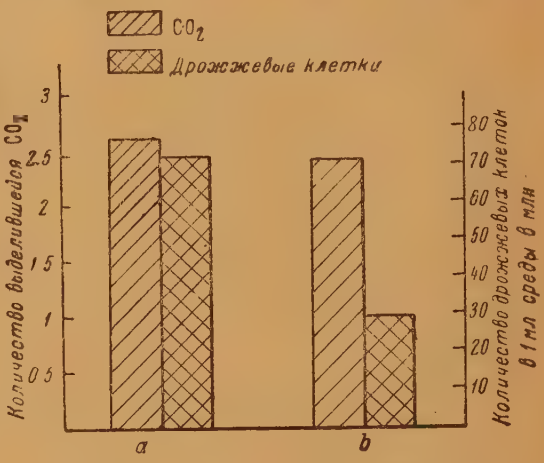


Рис. 6. *a* — Контроль 2. Сбраживание пивного сусла дрожжами XII расы при температуре 28—30°; *b* — Опыт. Сбраживание пивного сусла адаптированными дрожжами при температуре 40°.

среде, так как известно, что растворимость кислорода в среде понижается с повышением температуры.

В дальнейших работах [4] автор показал, что в условиях аэрации рост термофильных бактерий при высоких температурах значительно увеличивается. Мне приходилось также наблюдать при проведении опытов адаптации дрожжей к антисептику сернистому ангидриду значительное ослабление процесса размножения у дрожжей [3]. Возможно, что в данном случае в присутствии сернистой кислоты создавались более восстановленные условия в среде, что также угнетает функцию размножения у дрожжей.

В литературе имеется очень мало указаний по данному вопросу. В этом отношении известна лишь работа Jacobsen [5], который, проводя исследования по адаптации винных дрожжей к антисептику SO_2, наблюдал аналогичное явление. Анализируя данные вышеизложенной работы, мы видим, что брожение, проведенное обычными дрожжами (контроль 1), при температуре 40° проходит почти с той же интенсивностью, как и при температуре более низкой — 28—30°. Однако микроскопические наблюдения показывают, что в культуре в конце брожения происходит значительное отмирание клеток. Как уже указывалось в предыдущей работе [2], в данном случае, вероятно, биохимические процессы, происходящие в клетке, также подчинены правилу Вант-Гоффа. Возможно, что увеличение интенсивности процесса обмена в клетке приводит к ее быстрой деградации. Адаптированные к этой температуре дрожжи являются вполне жизнеспособными (после двухсуточного брожения при 40°) и вновь помещенные в свежее сусло сбраживают его при этой температуре с прежней интенсивностью. Проведенные «острые» опыты по брожению с термоустойчивыми дрожжами (опыты при 40°) и с дрожжами, развивающимися при обычной температуре (при 30°), показывают, что, взяв одинаковую биомассу дрожжей в течение наблюдаемого периода (6 часов), мы имеем одинаковый выход продуктов.

Эти опыты лишний раз подтверждают, что адаптированные к высокой температуре дрожжи, развиваясь при температуре на 10° выше, дают то же количество спирта, как и исходная культура, развивающаяся при 28—30°. При этом интересно отметить, что скорость сбраживания у адаптированных дрожжей при 40° в первые 3—4 часа выше, чем при брожении, протекающем в обычных условиях. На ускорение спиртового брожения при более высоких температурах (до 40°) указывают и данные Slator [7].

Более детальное изучение адаптированной расы дрожжей показывает, что она отличается по ряду признаков от исходной культуры. Так, при культивировании этих дрожжей при температуре 28—30° значительно ускоряется у них процесс размножения (в полтора-два раза) по сравнению с дрожжами обычными (контроль 2, табл. 4).

Дрожжи несколько мельче по величине, но вполне жизнеспособные и при повторном сбраживании свежего сусла развиваются с той же интенсивностью, не снижая выхода продуктов брожения. О зависимости величины бактерий от температуры культивирования указывают и данные Lamanna [6]. Автор изучил большое количество аэробных, не термофильных, спорообразующих бактерий. Им было установлено, что те культуры, которые имели более высокий температурный минимум и максимум роста, имели, как правило, меньшую величину клеток.

Автор приходит к выводу, что к бактериям, так же как и к млекопитающимся, птицам и некоторым беспозвоночным, применимо правило Bergmann, которое заключается в следующем: «расы и виды, живущие в холодном климате, имеют бо́льшую величину тела, чем те же расы, которые живут в теплом климате».

Происходящий наиболее интенсивный процесс размножения у адаптированных дрожжей при температуре 28—30°, помимо теоретического, имеет и большой практический интерес, так как увеличение биомассы при производстве дрожжей очень существенно.

Дальнейшее изучение физиологических и морфологических свойств адаптированной к повышенной температуре культуры, возможно, объяснит причины снижения и повышения интенсивности размножения у дрожжей, наблюдаемые в зависимости от температуры культивирования.

Выражаю глубокую благодарность проф. А. А. Имшенецкому за консультации по данному вопросу.

Выводы

Путем длительного культивирования дрожжей Saccharomyces cerevisiae XII расы при постепенно повышающейся температуре была селекционирована раса дрожжей, энергично развивающаяся при температуре 40°.

2. Адаптированные к высокой температуре дрожжи размножаются значительно медленнее, однако обладают высокой бродильной способностью.

3. При сбраживании сахаросодержащих сред адаптированными дрожжами при низкой температуре (28—30°), последние дают тот же выход продуктов брожения, как и обычные не адаптированные дрожжи, но размножаются в полтора-два раза быстрее.

4. В кратковременных опытах в первые часы брожения дрожжи, приученные к высокой температуре, сбраживают углеводы скорее, чем исходная культура, что позволяет говорить о большей активности одной клетки.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 5. II. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. А. Микробиологические процессы при высоких температурах. Изд. АН СССР, Москва, 1944.
2. Имшенецкий А. А. и Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей к повышенной температуре. Микробиология, т. XIII, вып. 4, стр. 136, 1944.
3. Логинова Л. Г. Адаптация Saccharomyces cerevisiae к сернистому ангидриду. Микробиология, т. X, вып. 2, стр. 216, 1941.
4. Imšenecki A. and Solnzeva L. The growth of aerobic thermophilic bacteria. J. Bact., v. 49, No. 6, p. 539, 1945.
5. Jacobsen E. Handbuch für die Getränke-Industrie. Getränke-Fabriken und der Getränke-Grossbetrieb. S. 628, 1925.
6. Lamanna C. Relation between temperature growth range and size in the genus bacillus. J. Bact., v. 39, No. 5, p. 593, 1940.
7. Slator A. Studies in fermentation. Part II. The mechanism of alcoholic fermentation. J. Chem. Soc., v. 93, p. 217, 1908.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Т. Н. Евреинова

Бактерии по их способности переносить различные температуры делятся на: 1) мезофильные и 2) термофильные формы. К мезофильным относится большинство известных микроорганизмов. Высшим температурным пределом их развития является +35 — 40°. К термофильным Имшенецкий [2] причисляет организмы, оптимальное развитие которых начинается с +60°.

Культура аэробных термофильных бактерий, из которой был получен белок, выделена Имшенецким как одна из сопутствующих форм целлюлозных анаэробных термофилов.

В литературе не было найдено указаний на химический состав белковых веществ термофильных организмов. Данная статья посвящена вопросу аминокислотного состава белка термофилов. Среда, на которой выращивались бактерии, не содержала азота в органической форме. Источником азота служила соль $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$, а источником углерода — растворимый крахмал. Бактерии выращивались на агаре при +60°. Бактериальная масса смывалась водой, пропускалась через марлю, центрифугировалась. Осадок высушивался в вакуум-эксикаторе после обработки спиртом. Белый порошок сухих бактерий извлекался последовательно водой, 5% NaCl и 0,2% NaOH. Извлечение 0,2% NaOH производилось при 0° в течение 30 минут. Из щелочной вытяжки, осаждением HCl, был получен нуклеопротеид. В нуклеопротеиде содержалось 17,80% азота, 1,49% фосфора, 0,46% серы и 0,88% золы. Белок подвергался гидролизу; в гидролизате были определены различные формы азота и аминокислоты. Гидролиз проводился по схеме, составленной из различных методов (Кизель [3]). В отдельных навесках были определены триптофан и цистин. В табл. 1 даются формы азота нуклеопротеида термофилов, для сравнения приводятся данные Белозерского [1] по нуклеопротеидам мезофилов и данные Tamura [5].

Таблица 1

Формы азота	Термофилы в % (Имшенецкий)	Мезофилы в %	
		Proteus vulgarjs (Белозерский)	Wasserbacillus (Tamura)
Гуминовый азот	10,10	—	27,1
Аммиачный азот	14,73	—	4,1
Азот оснований	20,10	35,32	18,9
Азот моноаминокислот	44,30	49,48	49,1

Примечание: Процент азота дан от общего азота гидролизата, принятого за 100.

Из сопоставления этих цифр следует, что нуклеопротеид термофильных бактерий не имеет резких отличий от нуклеопротеидов мезофилов.

Азот моноаминокислотной фракции преобладает над азотом оснований, что ясно указывает на кислый характер белка. В работах Белозерского [1] было показано, что белки нуклеопротеидов бактерий относятся к типу кислых соединений, а не принадлежат к протаминам или гистонам, как предполагали раньше. Азот пуриновых оснований — 2,60%, а пиримидиновых — 2,94%. Результаты определений аминокислот представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Содержание аминокислот в процентах от общего азота гидролизата

Название аминокислоты	Термофилы в %	Мезофилы в %		
		Щелочнорастворимый белок туб. палочки (Coghill [4])	Туб. палочки (Tamura [5])	Wasserbacillus (Tamura [5])
Аргинин	5,47	17,8	7,64	10,6
Гистидин	4,20	4,2	1,53	0,9
Лизин	9,14	7,5	1,49	3,2
Дикарбоновые кислоты	14,66	—	—	—
Тирозин	0,18	—	—	0,5
Фенил-аланин	2,50	—	7,31	—
Пролин + оксипролин	3,44	—	3,09	2,6
Лейцин	0,905	—	—	—

Из приведенных в табл. 2 данных следует:

1. В нуклеопротеиде много фенил-аланина и мало тирозина. Еще Tamura в 1914 г. [5] писал, что в тех бактериальных белках, где имеется много фенил-аланина, мало тирозина и наоборот.

2. Преобладание лизина (9,14%) над аргинином (5,47%) по представлениям Белозерского [1] свойственно белкам не запасного характера. У Proteus vulgaris 6,38% лизина и 3,83% аргинина (Белозерский [3]).

3. Большое количество дикарбоновых кислот содержится в целом ряде белков мезофилов. Например, по данным Белозерского [1] у Sarcina lutea — 18,9%, у Sorangium sp. — 21,39%.

Доказательством нуклеопротеидной природы выделенного белка служили: 1) способ извлечения 0,2% NaOH, 2) высокое содержание P,

Таблица 3

Содержание аминокислот в процентах от навески белка

Название аминокислоты	Термофилы	Щелочнорастворимый белок туб. палочки (Coghill [4])	Туб. палочки (Tamura [5])	Sorangium sp. (Белозерский [1])
Аргинин	2,95	7,6	2,16	3,68
Гистидин	2,68	2,1	0,51	1,42
Лизин	7,63	5,5	0,73	4,22
Дикарбоновые кислоты	27,10	—	—	21,39
Тирозин	0,43	0,9	—	3,73
Фенил-аланин	5,15	—	5,58	—
Пролин-оксипролин	4,95	—	5,05	—
Триптофан	3,56	1,19	—	—
Дистин	1,63	0,90	—	—
Лейцин	1,51	—	—	—

3) определение в гидролизате пуриновых и пиримидиновых оснований: ксантина, адеина, гуанина, урацила, 4) выделение фракции нуклеиновой кислоты по методу Белозерского [1]. Для установления типа нуклеиновой кислоты были определены пентозы по методу Jongburg в модификации Белозерского [1] и проделана реакция Feulgen, давшая отрицательный результат. На основании этих определений нуклеиновая кислота идентифицирована как дрожжевая нуклеиновая кислота.

Автор приносит благодарность профессору А. А. Имшенецкому за предоставление культуры термофильных бактерий.

Выводы

В результате всех вышеприведенных данных можно притти к заключению, что нуклеопротеид термофильных бактерий не имеет резких отличий в аминокислотном составе по сравнению с нуклеопротеидами мезофильных форм бактерий.

Московский государственный
университет им. Ломоносова
Ботанический институт

Получено 26.VII.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. Н. Нуклеопротеиды и полинуклеиновые кислоты растений. Докторская диссертация. МГУ, НИИБ, Москва, 1943.
2. Имшенецкий А. А. Микробиология анаэробного разложения целлюлозы. Микробиология, т. VIII, стр. 129, 1939.
3. Кизель А. Р. Практическое руководство по биохимии растений. Москва, 1934.
4. Coghill R. The chemical study of bacteria. J. Biol. Chem., v. 70, p. 447, 1926.
5. Tamura S. Zur Chemie der Bakterien. Z. physiol. Chem., Bd. 89, S. 288; Bd. 90, S. 286, 1914.

О РАССЕЛЕНИИ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ ПО ГИФАМ ГРИБОВ

Д. М. Новогрудский

При выделении из почв на агаровых питательных средах грибов часто наблюдают, как некоторые бактерии обволакивают в виде нежных чехлов грибные гифы и, следуя за их ростом, продвигаются по поверхности агара. Грибные колонии со вторгшимися в них бактериями приобретают необычный вид. В одних случаях достаточно уже внешнего осмотра, чтобы без помощи микроскопа отличить такие колонии по их слизистой консистенции (рис. 1 и 2). В других случаях они по внешнему виду не отличаются от нормальных и только после микроскопического исследования грибных гиф убеждаются, что по ним происходит энергичное передвижение бактерий (рис. 3).

Явления массового передвижения бактерий по гифам грибов давно известны микологам. Но последние уделяли им крайне мало внимания, а если и занимались ими, то главным образом — как досадным обстоятельством, затрудняющим выделение чистых культур грибов. Почвенные микробиологи также оставляли эти явления вне круга своего внимания, повидимому, потому, что не считали их типичными для условий почвы. Между тем явления массового расселения бактерий по гифам грибов характерны не только для лабораторных культур в искусственных условиях, но, как давно уже установлено Холодным [1, 2], широко распространены в природных условиях в почвах.

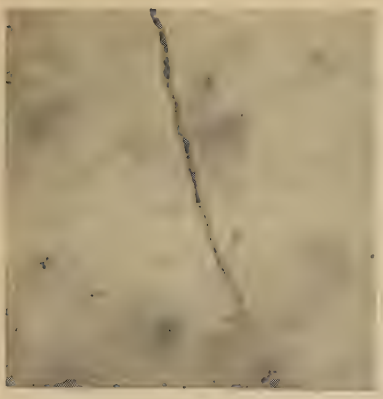
Настоящее исследование посвящено более подробному освещению этих процессов и их значения в экологии почвенных грибов.

Изолирование бактерий

Во всех наших опытах субстратом служил обыкновенный картофельный агар. Получение бактеризованных колоний грибов достигалось двумя путями.

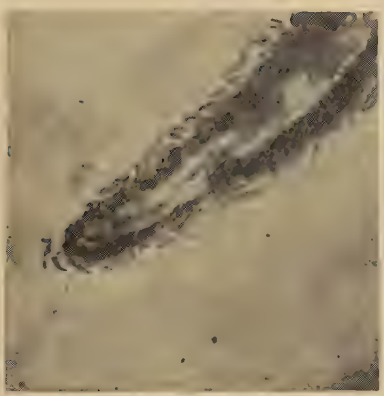
а) Спонтанное возникновение бактеризованных грибных колоний при посеве различных почв на пластинки картофельного агара. Этим путем были изолированы бактерии из гиф следующих грибов: Fusarium vasinfectum, Fusarim culmorum, Ambliosporium botrytis, Verticillium glaucum, Mucor racemosus, Hormodendrum sp., Alternaria tenuis, Cladosporium herbarum.

б) Искусственное получение бактеризованных грибных колоний методом «приманки» бактерий живыми грибными гифами. На пластинки картофельного агара высевали в виде гигантских колоний различные виды грибов. Когда поперечник колоний достигал приблизительно половины диаметра чашки, накладывали на мицелий на расстоянии 1—2 см от края колонии комочек влажной почвы, из которой предполагалось изолировать бактерии, передвигающиеся по гифам. Чашки помещали на 24 часа во влажную камеру при 25°. В этих условиях некоторые бактерии начинают покидать почвенный комочек и переселяться на поверхность грибных гиф, образуя вокруг последних обрастания в виде чехлов. Этим путем были изолированы бактерии из гиф следующих грибов: Mucor racemosus, Mucor stolonifer, Amblyosporium botrytis, Alternaria tenuis,



1

2



3

4

6

7

Рис. 1. Гифа Ambliosporium botrytis из однодневной колонии, окруженная бактериями

Рис. 2. Гифа Mucor racemosus из однодневной колонии, окруженная бактериальной слизью

Рис. 3. Гифа Mucor racemosus (24-часового возраста), окруженная палочковидными бактериями

Рис. 4. Стеклянный волос, помещенный на поверхность агаровой пластинки, моментально облекается водной пленкой

Рис. 6. По водной пленке, окружающей стеклянный капилляр, бактерии образовали слизистое обрастание

Рис. 7. Гифа Mucor racemosus из однодневной колонии, зараженной бактериями. Начальная фаза распада содержимого гиф

Trichoderma lignorum, Pyronema confluens, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Monilia sp., Cladosporium herbarum, Coniothyrium sp.

Не было получено положительных результатов при выделении бактерий на различных видах Penicillium. Все выделенные бактерии представляли довольно однообразную в морфологическом отношении группу, в которой преобладали флуоресцирующие или нефлуоресцирующие Pseudomonas. Из изученных более подробно 28 культур 26 относились к Pseudomonas, 1 — к Bacterium, 1 — к Bacillus.

Кроме бактерий, изолированных из бактеризованных грибных колоний, в некоторых опытах были использованы коллекционные чистые культуры: Pseudomonas fluorescens, Achromobacter denitrificans, Bacterium coli, Proteus vulgaris, Bacillus mycoides, Bacillus megatherium, Bacillus mesentericus, Bacillus subtilis, Micrococcus candicans, Sarcina lutea, Sarcina ureae.

Зависимость расселения по грибным гифам от вида бактерий и гриба

Прежде всего был исследован вопрос, все ли бактерии обладают способностью расселяться по грибным гифам и все ли грибы пригодны для такого передвижения бактерий. Для этого на колонии испытуемых грибов, имевших приблизительно 5 см в поперечнике, производили высев бактерий штрихом, проходящим приблизительно на равном расстоянии между центром и краем колонии. Через 24 часа краевые гифы колонии исследовали под микроскопом на присутствие вокруг них бактерий. При отрицательном результате повторяли контроль через 48 и 96 часов (пользуясь параллельными чашками той же серии). Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Способность различных бактерий к расселению по гифам грибов

№ п/п.	Бактерии	Amblicsporium botrytis	Alternaria tenuis	Mucor racemosus	Pyronema confluens	Penicillium glaucum
1	Pseudomonas fluorescens	+	+	+	+	—
2	Achromobacter denitrificans	+	+	+	+	—
3	Bacterium coli	+	+	+	+	—
4	Proteus vulgaris	+	—	+	+	—
5	Bacillus mycoides	—	—	—	—	—
6	Bacillus megatherium	—	—	—	—	—
7	Bacillus mesentericus	+	—	—	—	—
8	Bacillus subtilis	+	—	+	—	—
9	Micrococcus candicans	—	—	—	—	—
10	Sarcina lutea	—	—	—	—	—
11	Sarcina ureae	—	—	—	—	—

Из данных этой таблицы можно сделать следующие выводы.

1. Способность передвигаться по гифам грибов зависит как от природы бактерий, так и от природы гриба. Наиболее резко она выражена у Pseudomonas fluorescens, Achromobacter denitrificans, Bact. coli и совсем отсутствует у Bacillus mycoides, B. megatherium, Micrococcus candicans и обеих испытанных сарцин. Промежуточное положение заняли Proteus vulgaris, B. mesentericus, B. subtilis.

2. Формы, лишенные подвижности, вообще не способны расселяться по грибным гифам, но, с другой стороны, не все подвижные формы этой способностью обладают (Sarcina ureae).

3. В то время как по гифам одних грибов расселение бактерий происходит очень легко (Ambliosporium), по другим — оно может совершенно отсутствовать. Даже наиболее активные бактерии не были способны передвигаться вдоль гиф Penicillium.

Механизм расселения бактерий по грибным гифам

На агаровых пластинках передвижение бактерий происходит только вдоль гиф, стелящихся по поверхности агара. Гифы, уходящие в глубь субстрата, а также приподымающиеся над ним, никогда не являются путями передвижения бактерий. Субстратные гифы отличаются от глубинных и воздушных тем, что первые окружены тонкими водными пленками, поперечник которых раз в пять и больше превосходит ширину гиф. Эти водные пленки грибных гиф были в свое время неправильно приняты Porter [3] за желобки в агаре, возникшие вследствие энзиматической деятельности гиф. Представление Портера, что передвижение бактерий происходит по этим желобкам, является ошибочным. Оно происходит, как было отмечено Холодным [1], по водным пленкам грибных гиф, образующихся на влажных субстратах под действием сил поверхностного натяжения.

Микроскопическая картина передвижения бактерий по грибным гифам такова. Первые бактерии появляются в водных пленках субстратных гиф уже через несколько часов после заражения грибной колонии активными бактериями (например Pseudomonas fluorescens). Они оживленно передвигаются: одни — в направлении к верхушке гифы, другие — в обратном; некоторые неожиданно изменяют первоначальное направление движения. Со временем число бактерий становится больше. Особенно много их собирается в местах разветвления гиф, где водные пленки мощнее и толще. Картина передвижения этих бактерий напоминает движение снующих по тропинке муравьев. После некоторого времени все водное пространство, окружающее гифу, кишмя кишит бактериями. Вследствие отсутствия места они уже не в состоянии свободно передвигаться. Часть бактериальных клеток, оттесненная к краю водной пленки, в первую очередь теряет свою подвижность. Наиболее продолжительной подвижностью отличаются бактерии, находящиеся ближе к гифе и непосредственно к ней прилегающие. При заражении грибной колонии комочками почвы, вокруг каждой гифы сосредоточивается обычно какой-нибудь один вид бактерий. Проникнув в водную пленку грибной гифы, определенные виды бактерий становятся как бы хозяевами этого пространства и не дают возможности одновременно развиваться в нем другим видам бактерий [1].

Мы поставили себе задачей выяснить, какую роль в передвижении бактерий играют водные пленки грибных гиф сами по себе и возможные хемотактически действующие вещества, выделяемые грибами в водную пленку. Для этой цели изучалось расселение бактерий в водных пленках, искусственно воспроизведенных при помощи тонких стеклянных капилляров или нитей. Достаточно поместить тонкую стеклянную нить с поперечником около 25—30 μ на поверхность агаровой пластин-

[1] В некоторых случаях, когда из смеси спорообразующих и бесспоровых подвижных бактерий последние очень трудно отделить обычными приемами, применяемыми в микробиологических исследованиях, можно воспользоваться методом разделения, основанным на способности бесспоровых подвижных форм расселяться по грибным гифам. Этим способом иногда удается изолировать ничтожные примеси подвижных бактерий.

ки, чтобы она мгновенно облеклась тонкой водной пленкой (рис. 4). Если перпендикулярно к бактериальному штриху Pseudomonas fluorescens поместить стеклянную нить так, чтобы один ее конец соприкасался с бактериями (рис. 5, *а*), то уже через 20—30 минут можно под микроскопом установить оживленное передвижение бактерий по водной пленке стеклянной нити. Через несколько часов вокруг нити образуются такие же чехлы из бактериальных клеток, как вокруг живых грибных

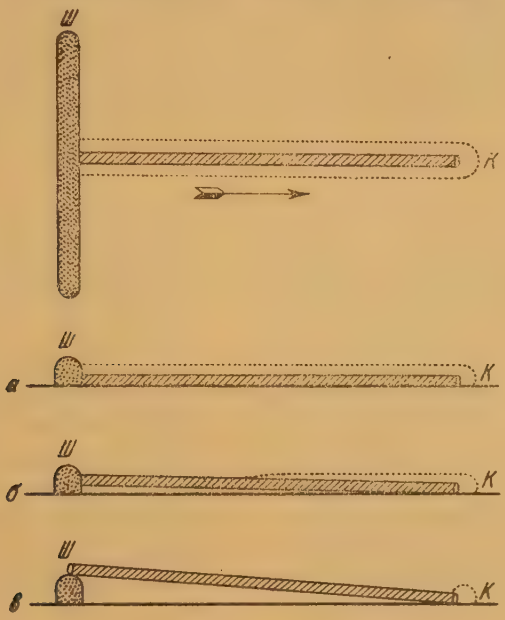


Рис. 5. Схематическое изображение бактериального штриха (*Ш*) и помещенного перпендикулярно к последнему стеклянного капилляра (*К*). Пунктиром отмечена водная пленка. Стрелка показывает направление передвижения бактерий от штриха в водную пленку. *а* — то же, в разрезе. Капилляр по всей длине примыкает к поверхности агара. Водная пленка образуется по всей длине капилляра. *б* — капилляр касается только одной частью поверхности агаровой пластинки. Водная пленка образуется только вдоль этой части капилляра. *в* — капилляр касается агаровой пластинки только в одной точке. Водная пленка имеется только в этой точке

гиф (рис. 6). Можно видоизменить опыт и при помощи тех же стеклянных нитей воспроизвести условия, представляющие аналогию с воздушными гифами. Для этого стеклянные нити помещают таким образом, как изображено на рис. 5, *б* и *в*. В этих случаях передвижения бактерий вдоль стеклянных нитей не происходит.

Из описанных опытов следует, что основным условием для передвижения бактерий по гифам грибов является подвижность бактерий и наличие вокруг грибных гиф микроскопических водных пленок. Так как процесс передвижения бактерий воспроизводится на искусственных пленках стеклянных капилляров, следует признать, что хемотактические вещества грибных гиф не являются для этого процесса необходимыми.

Однако между моделями из стеклянных нитей или капилляров и грибными гифами имеются и существенные отличия. В то время как любая подвижная бактерия способна расселяться по искусственным пленкам стеклянных нитей, и последние не оказывают влияния на бактериальные клетки, в случае живых гиф грибов обстоятельства складываются сложнее. С одной стороны, некоторые грибы (например

Penicillium) как бы противодействуют передвижению по их гифам даже наиболее активных бактерий. Можно допустить, что это связано с выделением гифами этих грибов каких-то бактериостатических веществ (например типа антибиотиков). В этом случае способность бактерий к передвижению по грибным гифам может явиться чувствительной пробой для обнаружения крайне малых концентраций этих веществ. С другой стороны, грибные гифы, повидимому, выделяют также вещества, стимулирующие развитие некоторых бактерий. Иногда наблюдают, что бактериальные клетки вокруг грибных гиф имеют бо́льшие размеры, чем клетки того же возраста на обычных питательных средах. Например, в бактериальных пленках, образованных Bacterium coli вокруг гиф Mucor racemosus, клетки Bact. coli имели в длину 1,8—3,8 μ; мелкие клетки в 1,8 μ встречались редко и значительное большинство клеток было больше 3,0 μ. В то же время в культурах B. coli того же возраста на картофельном агаре, на МПА и бульоне почти все клетки имели длину в 2,0—2,4 μ. Такие же отношения наблюдались в бактериальных пленках, образованных Achromobacter denitrificans вокруг гиф Ambliosporium botrytis.

Влияние бактерий на скорость роста грибных колоний

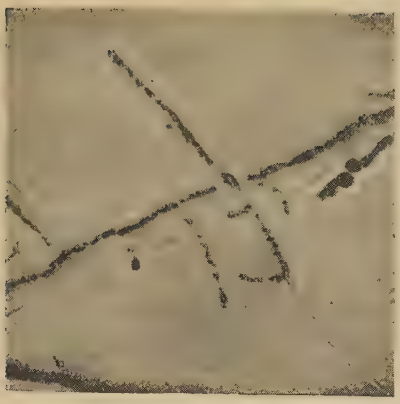
Инвазия бактерий в грибные колонии проявляется прежде всего в замедлении роста последних. В табл. 2 показаны размеры грибных колоний (средние из 3 параллельных определений), не зараженных и зараженных различными бактериями. Испытуемые бактерии разделены на две группы: а) нерасселяющихся и б) расселяющихся по гифам. Учеты проводились по достижении грибными колониями 3—4-дневного возраста (табл. 2).

Таблица 2

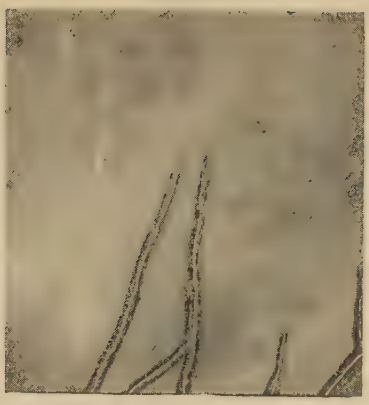
Размеры грибных колоний (в мм), не зараженных и зараженных бактериями

Название гриба	Контроль. Незараженные	Бактерии, не передвигающиеся по грибным гифам			Бактерии, передвигающиеся по грибным гифам			
		Bacillus megatherium	Bacillus mycoides	Sarcina lutea	Pseudomonas fluorescens	Proteus vulgaris	Bacterium coli	Bacillus subtilis
Mucor racemosus	102	102	100	108	80	83	78	76
Ambliosporium botrytis	108	100	103	98	85	82	70	76
Alternaria tenuis	87	80	92	83	78	75	51	63
Pyronema confluens	51	56	50	54	38	52	39	48
Cladosporium herbarum	96	86	83	90	68	80	70	78

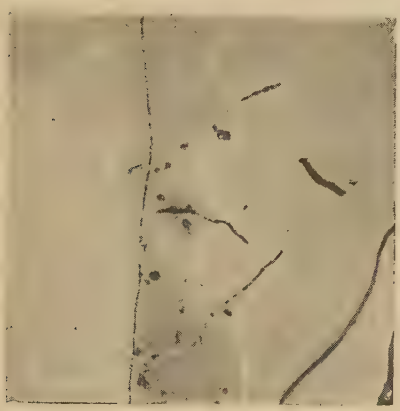
Из этих данных видно, что бактерии, неспособные передвигаться по грибным гифам, как правило, не оказывают угнетающего действия на скорость роста грибных колоний. Наоборот, бактерии, передвигающиеся по грибным гифам, в большинстве случаев сильно замедляют рост грибных колоний. В некоторых случаях это замедление может не проявляться в силу того, что гифы, окруженные бактериями, изменяют характер первоначального роста. Вместо того чтобы стлаться по агару, они приподымаются, дугообразно изгибаются, как бы стремясь скорее покинуть участки, занятые бактериями. Такие гифы отличаются быстрым ростом и отсутствием ветвлений. Перейдя на новый участок агаровой



8

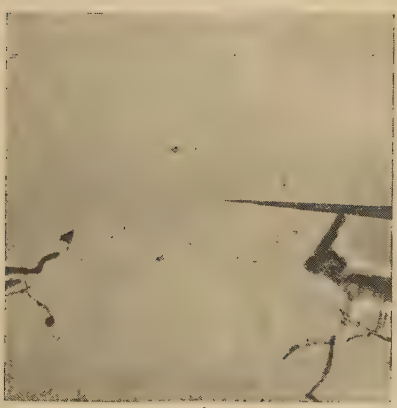


9

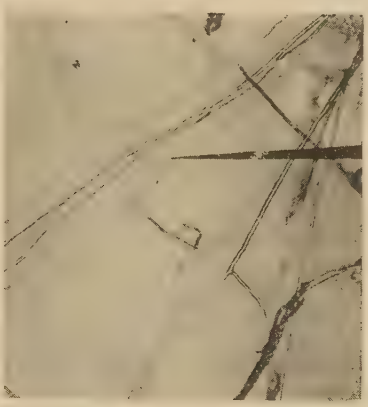


10

11



12



13

Рис. 8. Гифа Mucor racemosus из 48-часовой колонии, зараженной бактериями. Содержимое гифы концентрируется отдельными участками

Рис. 9. Гифа Ambliosporium botrytis из однодневной культуры, зараженной бактериями. Начальная фаза распада содержимого

Рис. 10. Гифа Ambliosporium botrytis из двухдневной колонии, заряженной бактериями, Содержимое гифы распадается на отдельные участки сгущения

Рис. 11. Бактеризованная гифа Mucor racemosus из трехдневной колонии. Верхушка бокового ответвления гифы лопнула

Рис. 12. Боковая гифа Ambliosporium botrytis с лопнувшей верхушкой

Рис. 13. Ambliosporium botrytis. Конечная стадия распада гиф. Оболочки гиф теряют резкие очертания.

Все микрофотоснимки (за исключением № 3) произведены при увеличении микроскопа 160 ×, а № 3 — при увеличении — 400 ×

пластинки, они начинают ветвиться и расти как субстратные гифы. Вследствие этого простое сравнение размеров грибных колоний не может дать точного представления о степени угнетения гиф бактериями. Более точно оно может быть характеризовано измерением скорости роста отдельных гиф.

Влияние бактерий на скорость роста грибных гиф

Одни «гигантские» колонии грибов заражали Ps. fluorescens, другие оставляли без бактерий, в качестве контроля. Одновременно (с несколькими микроскопами, снабженными винтовыми окулярными микрометрами) производились измерения скорости роста гиф в бактеризованных и небактеризованных колониях. В каждом случае отсчеты производились на пяти гифах, из которых каждая наблюдалась в течение 20 минут (два измерения через 10-минутные промежутки). В табл. 3 приводятся результаты, полученные для гиф Mucor racemosus однодневного возраста.

Таблица 3

Скорость роста бактеризованных и небактеризованных гиф Mucor racemosus односуточного возраста

№ гифы	Время наблюдения	Прирост гифы без бактерий в μ	Прирост гифы, окруженной бактериями, в μ
1	16 ч. 30 мин. — 16 ч. 40 мин.	203	122
	16 » 40 » — 16 » 50 »	173	107
		376	229
2	16 » 53 » — 17 » 03 »	212	146
	17 » 03 » — 17 » 13 »	154	146
		366	292
3	17 » 24 » — 17 » 34 »	265	163
	17 » 34 » — 17 » 44 »	201	132
		466	295
4	17 » 59 » — 18 » 09 »	245	109
	18 » 09 » — 18 » 19 »	248	127
		493	236
5	18 » 33 » — 18 » 43 »	210	108
	18 » 43 » — 18 » 53 »	198	104
		408	212

Из этих данных видно, что однодневные гифы M. racemosus имели максимальную скорость роста 493 μ в 20 минут, тогда как для бактеризованных гиф при тех же условиях она составляла только 295 μ. Еще более резко выступает эта разница между бактеризованными гифами двухдневного возраста (табл. 4).

Небактеризованные гифы двухдневного возраста в этом опыте имели максимальную скорость роста 184 μ в 20 минут, тогда как бактеризованные гифы того же возраста уже совершенно перестали расти.

Такие же результаты получались с другими видами грибов и бактерий, образующих вокруг их гиф пленочные обрастания. Разница заключалась лишь в том, что в одних случаях полная остановка роста гиф наступала ранее, в других — позднее.

Основная причина прекращения роста гиф заключается в том, что бактерии, плотным чехлом окружающие грибные гифы, представляют

Таблица 4

Скорость роста (в μ/10 минут) бактеризованных и небактеризованных гиф Mucor racemosus двухдневного возраста

№ гифы	Время наблюдения	Прирост гифы без бактерий в μ	Прирост гифы, окруженной бактериями, в μ
1	15 ч. 45 мин. — 15 ч. 55 мин.	12	0
	15 » 55 » — 16 » 05 »	81	0
		143	0
2	16 » 06 » — 16 » 16 »	88	0
	16 » 16 » — 16 » 26 »	96	0
		184	0
3	16 » 30 » — 16 » 40 »	71	0
	16 » 40 » — 16 » 50 »	68	0
		139	0
4	16 » 55 » — 17 » 05 »	83	0
	17 » 05 » — 17 » 15 »	78	5
		161	5
5	17 » 20 » — 17 » 30 »	63	0
	17 » 30 » — 17 » 40 »	74	0
		137	0

собой мощный кислородный барьер и благодаря этому создают вокруг грибной гифы условия анаэробиоза. Недостаток необходимого кислорода является причиной сначала замедления и затем — полной остановки роста грибных гиф.

Влияние бактерий на структуру гиф

Создаваемый бактериями анаэробиоз вызывает ряд изменений в морфологической структуре живых грибных гиф. Они проявляются прежде всего в их протоплазменном содержимом. Уже у молодых гиф однодневного возраста в томогенной протоплазме образуются многочисленные уплотнения в виде стяжений и неправильных очертаний глыбок. На следующие сутки обособление плазменных коагулятов внутри гиф становится еще более резким и такие гифы перестают расти. Иногда преобладающая часть содержимого гифы стягивается в определенные участки, а в местах, где нет протоплазмы, оболочки опадают (рис. 7—10). Нередко у боковых ответвлений бактеризованных гиф наблюдается лопание верхушек и вытекание из них содержимого. Такие гифы полностью нежизнеспособны (рис. 11—12). У бактеризованных гиф большего возраста наблюдаются более интенсивные процессы распада. Содержимое гиф подвергается полному автолизу, а нередко начинается разрушение оболочек. Они становятся очень тонкими и распадаются на отдельные фрагменты (рис. 13). Так как аналогичные структурные изменения грибных гиф наблюдаются, когда их помещают в атмосферу углекислого газа или когда их вообще лишают кислорода (Reinhardt [4]), можно принять, что и в данном случае основной причиной описанных патологических изменений является анаэробиоз, созданный окружающими гифы бактериями.

Экологическое значение процессов расселения бактерий по грибным гифам

Из вышеизложенного ясно, что расселение бактерий по грибным гифам далеко не является мирным сожительством разных почвенных микроорганизмов. Эти широко распространенные процессы представляют собой одно из ярких проявлений борьбы за жизненные условия, которая завершается или угнетением роста гриба, или его полной гибелью. Среди природных почвенных факторов, ограничивающих активность грибов, немалая роль принадлежит явлениям расселения бактерий по грибным гифам и, как их следствию, образованию вокруг гиф зон анаэробиоза, прекращению их роста и их структурному распаду. Вещества, образующиеся в результате автолиза грибных гиф и распада их оболочек, активируют новые группы почвенного микронаселения, которые вновь вовлекают эти вещества в жизненные циклы органогенных элементов.

Выводы

1. Явления передвижения и расселения почвенных бактерий по гифам грибов широко распространены в природных условиях в почвах.

2. Для расселения по гифам грибов необходимо, чтобы соответствующие бактерии обладали подвижностью. Однако не все подвижные формы обладают этой способностью. Последняя зависит как от вида самих бактерий, так и гриба. Наиболее резко она выражена у Pseudomonas fluorescens, Achromobacter denitrificans, Bacterium coli и совсем отсутствует у Bacillus mycoides, B. megatherium, Micrococcus candicans, Sarcina lutea; промежуточное положение занимают Proteus vulgaris, B. mesentericus, B. subtilis. В то время как по гифам одних грибов бактерии свободно передвигаются, по другим передвижение совершенно отсутствует.

3. Возможность передвижения бактерий по грибным гифам обусловлена наличием вокруг последних микроскопически тонких водных пленок. Некоторые виды грибов (Penicillium) выделяют в окружающие их водные пленки бактериостатические вещества, препятствующие бактериям концентрироваться в этих пленках. У других видов (Ambliosporium) возможно выделение стимулирующих веществ, благоприятствующих развитию бактерий.

4. Расселение бактерий по грибным гифам приводит к образованию вокруг последних «бактериальных чехлов». Такие бактериальные обрастания грибных гиф создают вокруг последних условия анаэробиоза. Недостаток или полное отсутствие кислорода обусловливают резкое угнетение, а затем и полное прекращение роста грибных гиф и их структурный распад. При распаде гиф содержимое их подвергается лизису, а оболочки утончаются, частично растворяются и раздробляются на фрагменты.

5. Описанные процессы, связанные с расселением бактерий вокруг почвенных грибов, являются одним из важных факторов, ограничивающих активность грибов в почвах.

Институт почвоведения
Академии Наук КазССР
Алма-Ата

Получено 30. IV. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Холодный Н. Г. Почвенная камера как метод исследования почвенной микрофлоры. Микробиология, т. II, стр. 321, 1933.
2. Cholodny N. Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. Arch. Mikrob., Bd. I, 1930.
3. Porter C. L. Mixed cultures of bacteria and fungi. Proc. Ind. Acad. Sci., v. 41, p. 149, 1932.
4. Reinhardt M. O. Wachstum der Pilzhyphen. Jahrb. wiss. Botanik, Bd. 23, S. 479, 1892.

АЦЕТОНО-ЭТИЛОВЫЕ БАКТЕРИИ

IV. ИЗМЕНЧИВОСТЬ АЦЕТОНО-ЭТИЛОВЫХ БАКТЕРИЙ

М. Д. Чумак

В 1920—1921 гг. Arkwright [1] обратил внимание на существование у бактерий гладких (S-) и шероховатых (R-) форм колоний. После обнаружения подобных форм у разных видов бактерий и описания их последовало изучение физиологии этих вариантов. Изменение формы колоний какого-либо вида бактерий часто сопровождается изменением и физиологических признаков, биологической активности или вирулентности. Изменение может итти как по пути приобретения нового свойства, так и по пути его утраты. Если потеря вирулентности патогенными микробами является весьма желательным явлением и задача экспериментатора — создание условий, способствующих этому, то потеря активности или даже ее уменьшение у бактерий, имеющих практическое значение, представляют крайне неприятное явление, которое необходимо избегать.

При изучении биологии ацетоно-этиловых бактерий нам пришлось столкнуться с фактом спонтанного возникновения колоний иной формы, чем исходные. Изменчивость ацетоно-этиловых бактерий еще никем не описана, и изучение ее представляет несомненный интерес.

Экспериментальная часть

1. Характер колоний

Со времени первого определения Аркрайтом вариантов колоний как S- и R-форм обозначение новых форм колоний усложнилось обозначениями O-, M-, G- и т. д.

Такое разнообразие названий вполне естественно, так как богатство форм, создаваемых природой, часто не укладывается в тесные рамки учения о диссоциации микробов.

Наблюдаемые нами формы колоний Bac. acetoethylicus также не дают отчетливых признаков, позволяющих назвать их одним из известных обозначений. Внешний вид исходного типа колоний Bac. acetoethylicus только отчасти напоминает R-форму. Они не имеют настоящей типичной шероховатости, и мы будем называть исходный тип колоний ацетоно-этиловых бактерий «лопастным»; новый вариант, имеющий внешние признаки S-формы,— «гладким».

Типичные колонии Bac. acetoethylicus в 3—4-дневном возрасте имеют округлую форму с лопастными выростами неравной величины. Край такой колонии имеет несимметрично расположенные зубцы. Центральная часть колонии образует слегка возвышающуюся плоскость неправильной формы, от которой расходятся едва заметные лучи, создающие радиально-фестончатый край колонии.

Центральную часть колонии окружает средняя зона колонии; она плоская, с более резко очерченными зубцами, отчасти повторяющими неровности центральной части. По краю колонии проходит третья зона — самая молодая, ее зубцы повторяют очертания зубцов второй

[1] Arkwright S. A. Variation. A system of bacteriology, v. I, 1930.

зоны, но выражены более резко. Средняя и крайняя зоны как бы вытекают из-под центральной части колонии, что подтверждается и временем наступления спорообразования. В то время как в центральной части зоны почти все клетки переходят к спорообразованию и вся эта зона становится беловатой, в периферической прозрачной части колонии находятся только молодые, подвижные клетки. Молодая лопастная колония обладает слабым блеском.

Возникающие в процессе изменчивости гладкие колонии в молодом возрасте обладают влажным блеском и имеют каплевидную форму. Колонии слизистые. В 3—4-суточном возрасте такая колония имеет круглую форму с гладкими краями, слегка возвышающимися над поверхностью, так как в это время уже начинается спорообразование и центральная часть колонии становится ниже. Колония становится белой и не слизистой. В старой колонии хорошо заметны концентрические круги, возникающие по мере наступления спорообразования.

Молодая форма возникает спонтанно при лабораторном культивировании. Ее появлению особенно способствует рост на плотных средах. При высеве культуры ацетоно-этиловых бактерий, выделенных в разное время и из различных источников, на картофельный агар наряду с обычными лопастными колониями вырастают гладкие колонии.

Процент гладких колоний повышается при выращивании культуры на плотных средах. Как видно из табл. 1, частота, с которой образуются гладкие варианты, в два раза больше при частых пересевах исходной лопастной культуры на плотной среде. Возможно, что образованию гладкого варианта предшествует образование дочерних колоний в виде узелков, которые в старых лопастных колониях достигают заметной величины. Высев из таких дочерних колоний дает колонии гладкой формы.

В колониях гладкого варианта можно наблюдать образование дочерних колоний в виде узелков, секторов и веерообразных колоний, выходящих за пределы материнской колонии (рис. 1).

Таблица 1

Образование гладких вариантов Bac. acetoethylicus при различных условиях культивирования исходного лопастного варианта

№ опыта	Среда	Количество пассажей	Общее количество колоний	Лопастные колонии	Гладкие колонии	% гладких колоний от исходного
1	Жидкий картофель . .	5	44	41	3	7
2		5	17	16	1	7
3		5	30	28	2	7
1	Картофельный агар . .	5	14	12	2	14
2		5	40	34	6	15
3		5	56	49	7	13

Высев бактерий из этих дочерних колоний дает такие же гладкие колонии. Длительное хранение (1 год) культуры, содержащей споры, не оказывает никакого влияния на форму гладких колоний. Пересевы гладкого варианта в течение длительного срока не сопровождаются изменением формы колонии, и это доказывает устойчивость мутанта. Только продолжительное культивирование на жидкой картофельной среде с частыми пересевами молодой культуры (без спорообразования) приводит к образованию нетипичных гладких колоний. Так, после двадцати пяти параллельных пассажей молодой культуры обоих вариантов на жидкой картофельной среде, при высеве на картофельный агар

образовались колонии, очень сходные между собой по внешнему виду. Они имеют округлую форму центральной части колонии и периферическую часть с неровным краем, напоминающим зубцы. При более низкой температуре (18—20° вместо 40°) края таких колоний часто дают слизистый валик, неоднократно описываемый у колоний других бактерий. Будучи пересеяны на свежую среду, такие колонии снова дают колонии S-формы или такие же нетипичные. Колоний лопастной формы не наблюдалось, следовательно, о реверсии не может быть речи.

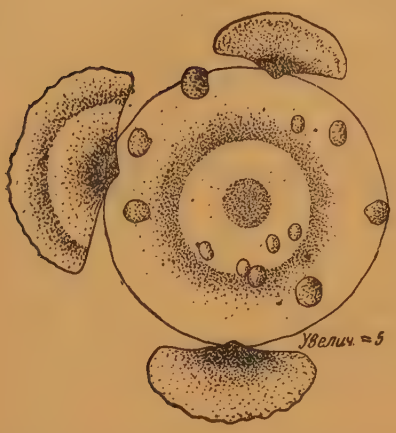


Рис. 1. Колония гладкого варианта, на поверхности которой возникли дочерние колонии

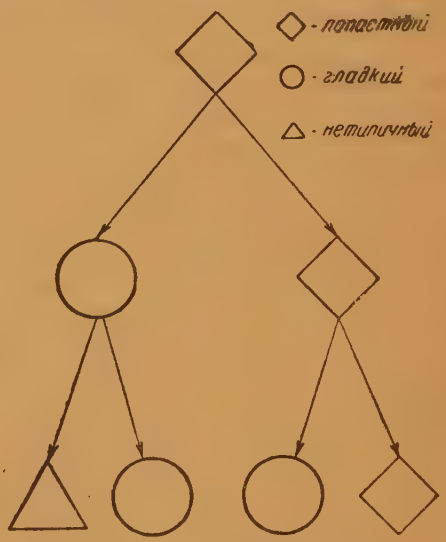


Рис. 2. Схема образования Bacacetoethylicus

Схематичное изображение процесса образования вариантов представлено на рис. 2.

2. Сопоставление вариантов

а) Характер микроколоний. Для наблюдения за образованием микроколоний применялись агаровые блоки, приготовленные следующим образом: на стерильное покровное стекло платиновой петлей наносилась капля расплавленного агара. Стекло наклонялось, чтобы капля, стекая, оставила на стекле тонкий слой агара. После этого на застывший агар наносилась капелька очень разбавленной суспензии молодой 17—15-часовой культуры бактерий, края стекла смазывались стерильным вазелином и прикреплялись к предметному стеклу с луночкой. Приготовленные таким образом препараты помещались в чашки Петри и оставлялись при температуре 38—40°. Через определенные промежутки времени, через 2—3, а иногда и большее число часов, препараты микроскопировались и происшедшие изменения зарисовывались.

Обычно S- и R-формы колоний у бактерий в самом начале своего развития имеют различное строение, так как клетки в них расположены неодинаково.

При наблюдении за образованием микроколоний в культуре лопастного и гладкого вариантов не наблюдается резких различий. Скользящее движение клеток после деления, характеризующее главным образом S-форму, наблюдалось нами у ацетоно-этиловых бактерий в обоих случаях. Только в микроколониях лопастного варианта чаще встречается расхождение клеток с образованием V-образной формы (рис. 3, 1-час.— лопастный, *а*). Общая картина образования микроколоний лопастного и гладкого вариантов представлена на рис. 3.

Рис. 3. Образование микроколоний гладкого и лопастного вариантов

При зарисовке микроколоний лопастного и гладкого вариантов точно зарисовывалось расположение клеток в одном и том же месте препарата, через определенные промежутки времени.

В первой зарисовке препаратов, спустя 1 час 15 мин.— 1 час 20 мин. после их приготовления, видны только отдельные клетки, сразу же после их деления. Клетки располагаются рядом вследствие соскальзывания отделившейся клетки вдоль тела другой (положение клеток *б* в колонии лопастной культуры, рис. 3). Через 2—3 часа видно увеличение числа клеток, причем прирост их идет, судя по наблюдаемым препаратам, быстрее в колониях лопастного варианта, так как количество в колониях этого варианта в трехчасовом препарате почти одинаково с количеством клеток в шестичасовых колониях гладкого варианта. Но, конечно, говорить о различной скорости размножения на основании этих наблюдений пока еще нельзя.

В возрасте 15—20 часов микроколонии не увеличиваются в размерах (вероятно, сказывается недостаток питательных веществ), и в клетках начинается спорообразование. Этим заканчивались наши наблюдения над микроколониями.

На образование колоний S-формы, возможно, оказывает влияние слизь. Хотя в микроколониях клетки обоих вариантов плотно лежат друг около друга и незаметно ни капсул (проверка с тушью), ни слизи, в молодых колониях на картофельной среде в чашках Петри у гладкого варианта имеется масса слизи. Из 24—40-часовой колонии гладкого варианта трудно сделать мазок, и даже в кусочке колонии, раздавленном стеклом, клетки иногда лежат в скоплениях слизи. Как всякая малотекучая жидкость, слизь склеивает отдельные клетки и тем самым, возможно, оказывает влияние и на форму колонии гладкого варианта. В колониях лопастного варианта, почти не имеющих слизи, бактерии могут легко и свободно двигаться, образуя различные выросты.

Размеры клеток на картофельном агаре обоих вариантов одинаковы, 0,48 — 0,64 $\mu \times$ 5,2 — 10,4 μ (некоторые данные о величине клеток — в табл. 2). Но споры, образовавшиеся в культуре, выросшей на агаре из почвенной вытяжки, у вариантов несколько отличаются. У лопастного варианта они кажутся слегка вытянутыми, так как диаметр споры не-

Таблица 2

Величина клеток гладкого и лопастного вариантов

Вариант	Возраст — 15 часов, размеры в μ, среднее арифметическое многократных измерений			
Гладкий	0,56×7,1	0,6×8,2	0,48×7,6	0,64×10,4
Лопастный	0,48×5,6	0,56×5,2	0,64×5,6	0,64×9,2

много меньше. Размер спор у гладкого варианта в этих условиях при окраске метиленовой синью около 1,5 $\times$ 1,0 μ, а у лопастного 1,5 $\times$ 0,9 μ.

Никаких иных отличий в морфологии клеток вариантов не обнаружено.

Обычно S- и R-варианты бактерий отличаются по способности к агглютинации. Мы применили методику агглютинации с трипафлавином.

Равномерная взвесь бактерий в количестве 4—5 капель вносилась в раствор трипафлавина различной концентрации и оставлялась на два часа при 37°. При концентрации трипафлавина 1 / 8000 и 1 / 2000 агглютинации вообще не было. При более высокой концентрации — 1/1000 наблюдалось образование мелкого хлопьевидного осадка в пробирках как с лопастным, так и с гладким вариантом. Таким образом, отношение вариантов к агглютинации одинаковое.

Некоторое отличие наблюдается в культуральных признаках вариантов. Бактерии S-формы очень быстро обесцвечивают лакмус-молоко, полностью свертывая его в течение первых 24 часов. Бактерии лопастного варианта обесцвечивают молоко через 2 суток и только слегка свертывают. Очень резкой разницы в культуральных признаках, как это видно из данных, приведенных в табл. 3, нет.

Таблица 3

Культуральные признаки вариантов

Среда	Лопастной вариант	Гладкий вариант
МПЖ (уколом)	Слабый рост на поверхности. По уколу — отдельные колонии. Цвет светлокоричневый. Разжижения нет	Плотная колония на поверхности. По всему уколу рост слабый в виде отдельных колоний, бесцветный. Разжижение очень слабое
Картофельный агар (уколом)	Рост по всему уколу. Пигментации нет	То же
(артофельный агар штрихом)	Матовый, почти прозрачный, очень скудный рост. Мелкозернистый. Край мелкозазубренный	Серовато-желтоватый рост. Блестящий, обильный. Край мелкозазубренный
Морковь	Оранжевый цвет моркови. Через 24 часа становится грязножелтым. Морковь разрыхляется и через 3 суток превращается в кашицу серого цвета	То же
Лен (снопики)	Мацерирует со слабым образованием газа	То же
Молоко с лакмусом	Обесцвечивание через 4 суток. Молоко только слегка свертывается	Обесцвечивается через 1 сутки. Свертывается полностью
МПБ	Слабая пленка на 2—3-й день. Легкая муть. Слабые слизистые тяжи с мелом, подымающиеся со дна	То же, но мути нет, слизи больше

Скорость изменения тех или иных сред (молоко, картофель), вероятно, зависит от различной ферментативной активности вариантов. Гладкий вариант оказался более активным в биохимическом отношении, и этому вопросу будет посвящено наше следующее сообщение.

Приношу искреннюю благодарность проф. А. А. Имшенецкому за руководство работой.

Выводы

1. Выделяемые из естественных субстратов (почва, картофель) культуры Bac. acetoethylicus дают на плотных средах только лопастные колонии.
2. Лопастный вариант легко отщепляет гладкий вариант Bac. acetoethylicus, который является стойким мутантом и не возвращается к исходному типу.
3. Отсутствие существенной разницы в структуре микроколоний, отсутствие складчатости у колоний, одинаковое отношение к агглютинации говорит о том, что лопастный вариант не может быть принят за R-форму.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 5. VIII. 1946

ОБ ЭКОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ ЛЕВО- И ПРАВОЗАВИТЫХ ФОРМ BAC. MYCOIDES (FLÜGGE)

О. К. Настюкова и В. В. Алпатов

В 1922 г. Gersbach [10] описал редкую форму Bac. mycoides Flügge, у которой нити колоний при посеве на твердую среду дают завитки, направленные по часовой стрелке, в отличие от обычной формы этой бактерии, колонии которой дают завитки с вращением против часовой стрелки. Lewis [11] показал, что правые штаммы (с завитками по часовой стрелке) отличаются от левых ослабленной способностью сбраживать сахарозу: шесть левых форм показали высокую ферментативную активность, тогда как ослабленная способность наблюдалась у трех левых форм и у всех 11 изученных правых форм. Люис отмечает, что корреляция между направлением вращения завитков и сбраживанием сахарозы не является вполне строгой.

В 1938 г. по ходу работ, связанных с проблемой асимметрии протоплазмы, Гаузе [2, 8] подверг систематическому исследованию лево- и правозавитые формы Bac. mycoides.

Гаузе нашел, что правые и левые колонии отличаются своеобразным отношением к температуре. При росте левой колонии в зоне 20—36° наблюдается при переходе к более высоким температурам все большее ускорение роста, тогда как для правой формы температурная кривая поднимается медленнее с уменьшающимся ускорением.

Гаузе ([3], стр. 83) задает вопрос: «имеем ли мы, однако, право обобщать эти наблюдения и сказать, что установленные нами специфические различия в температурной зависимости роста связаны с правизной и левизной изученных форм. Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо было поставить опыты на большем числе форм Bac. mycoides. С этой целью мы исследовали три правых и две левых формы и обнаружили, что «тепловое повреждение» при росте представляет собой свойство, характерное вообще для форм Bac. mycoides различного происхождения».

Далее, при испытании этих пяти форм на реакцию Люиса Гаузе нашел, что все правые формы не дают подкисления среды, т. е. не могут расщеплять сахарозу, тогда как из левых двух форм обе дали подкисление. Кроме того, у Гаузе был один сомнительный случай, о котором он упоминает, не сообщая подробностей. Все же это дает Гаузе основание сказать, что «реакцию Люиса можно трактовать как известную ферментативную слабость инверсных правых штаммов по сравнению с обычными левыми штаммами» ([3], стр. 84).

«Тепловое повреждение» правых форм Bac. mycoides Гаузе связывает с «тепловым повреждением», обнаруженным им и Смарагдовой [5, 8] при культивировании Torula utilis и Aspergillus niger на неестественных изомерах некоторых аминокислот. Это «повреждение» используется Гаузе для истолкования «теплового повреждения» правых форм Bac. mycoides. Он пишет [8]: «мы можем предположить, что торможение роста у морфологически инверсной формы наступает потому, что внутри клетки находится инверсный по отношению к норме оптический изомер какого-то детерминирующего форму органического вещества». Этот автор придает описываемому им «тепловому повреждению» и ре-

акции Люиса большое теоретическое значение, подробно обсуждая эти явления в V главе своей книги [3] «О связи морфологической инверсии» и в главе IV английского издания этой книги [9].

В 1945 г. по ходу продолжения работ по инверсным формам различных микроорганизмов в лаборатории экологии Института зоологии МГУ было решено провести некоторые дополнительные исследования инверсных форм Bac. mycoides.

Ввиду того что получить от Гаузе культуры, с которыми он работал, нам не удалось, мы обратились на кафедру микробиологии МГУ и в Институт микробиологии Академии Наук СССР. Благодаря любезности проф. Мишустина в марте 1945 г. нами были получены четыре культуры, выделенные из почв окрестностей оз. Севан (Армения): формы левозавитые L_2 и L_3 и правозавитые D_1 и D_2. Лаборатория микробиологии МГУ передала нам одну левозавитую культуру (L_1) неизвестного географического происхождения. Нами ставилась задача исследовать рост инверсных форм на средах с примесью оптических изомеров акрихина. Метод, принятый нами [1], состоял в измерении диаметра колоний, развивавшихся на поверхности агара. Первые же опыты культивирования при разных температурах, которые мы выбирали для проведения работы с акрихином, дали результаты, отличающиеся от сходных опытов, описанных Гаузе. Поэтому решено было поставить ряд специальных температурных опытов.

Методика

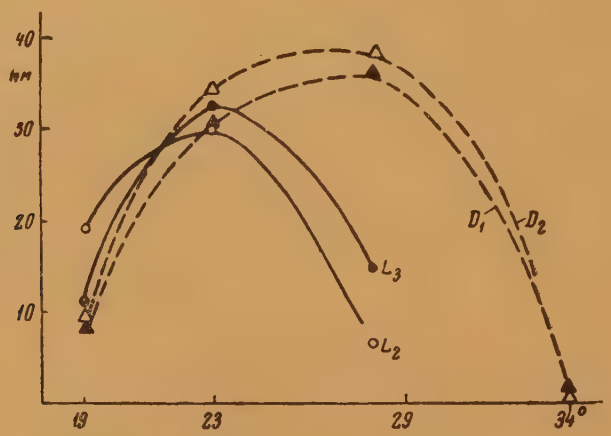
Посевной материал брался из двухсуточных культур на агаре, развивавшихся при 23°. Посев производился уколом на поверхность агара в чашки Петри, по 4 укола в каждую чашку. Среда готовилась следующим образом: 200 г нарезанного картофеля подвергались кипячению в течение получаса в литре воды, после чего в процеженный отвар добавлялся агар в количестве 3,5%. Диаметр колоний измерялся циркулем через 48 часов после постановки чашек Петри в политермостат.

Таблица 1

Рост колоний Bac. mycoides в мм при разных температурах в 1945 г. (средние арифметические)

№ опыта	Дата посева	Дата промера	Штамм	19°	20°	23°	25°	27°	28°	29°	34°	35°
1	3.V	4.V	L_1	—	—	—	7	7	—	—	—	—
		5.V	L_1	—	—	—	30	14 5	—	—	—	—
		4.V	L_2	—	—	—	7,7	9 7	—	—	—	—
		5.V	L_2	—	—	—	30,8	19,5	—	—	—	—
		4.V	D_1	—	—	—	14,0	12,1	—	—	—	—
		5.V	D_1	—	—	—	47,2	52	—	—	—	—
2	5.V	7.V	L_2	—	14,5	—	32,5	—	—	4,5	—	0
		7.V	D_1	—	14,0	—	37,0	—	—	31,0	—	1,2
3	8.V	10.V	L_1	19,2	—	31,0	—	—	4,0	—	0	—
		10.V	L_2	23,0	—	34 2	—	—	8,0	—	0	—
		10.V	L_3	12	—	35,2	—	—	10,0	—	0	—
		10.V	D_1	11,2	—	38,5	—	—	45,5	—	1,5	—
		10.V	D_2	11,5	—	38,5	—	—	49	—	0,5	—
4	10.V	12.V	L_1	18	—	26,5	—	—	2,0	—	0	—
		12.V	L_2	19	—	30,0	—	—	6,5	—	0	—
		12.V	L_3	11	—	32,5	—	—	15,0	—	0	—
		12.V	D_1	9	—	30,5	—	—	36,5	—	1,5	—
		12.V	D_2	9,5	—	34,0	—	—	38,0	—	1,0	—

Определение ферментативной силы разложения сахарозы (реакция Люиса) шло следующим образом. В 100 см³ картофельного отвара вносилось 3,5 г агара, 2 г сахарозы и добавлялась феноловая красная до появления красной окраски раствора. Среда стерилизовалась, производился разлив в чашки Петри и засев. Через 24 часа и 48 часов отмечалось изменение окраски в зоне роста колоний. В части опытов сила роста колоний охарактеризовалась по трехбальной шкале: сильно, средне и слабо, а в части опытов производилось измерение диаметра колоний циркулем. Результаты опытов по влиянию содержания Bac. mycoides в различных температурах приведены в табл. 1 и частично на рисунке.



Величина колоний Bac. mycoides через 48 часов при различных температурах. Опыт 4.

Мы обнаруживаем обычную для жизненных процессов двухфазную зависимость от температуры: зону ускорения роста, оптимум и зону угнетения. При сравнении попарно инверсных штаммов Bac. mycoides из Армении намечается более высокий оптимум (27°) для правых штаммов, чем для левых штаммов, оптимум роста которых падает примерно на 24°. Интересные наблюдения Мишустина показали, что оптимум роста Bac. mycoides различного географического происхождения вариирует крайне сильно. Так, например, оптимум роста культур из Архангельска приходится на 26°, а культур из Ташкента — на 37°. Культуры, имевшиеся в нашем распоряжении, из окрестностей оз. Севан дают сравнительно очень невысокие оптимумы, что, повидимому, может быть объяснено высокогорным положением озера. На сходство горных форм Bac. mycoides с формами севера указывает Мишустин [6]: «Весьма интересно, что почвы южных горных черноземов имеют формы Bac. mycoides, тождественные с встречаемыми в северных черноземах. В Армении достаточно подняться на 1 500—2 000 м в горы и встречающиеся формы Bac. mycoides коренным образом меняются».

Приведенные нами данные стоят в резком противоречии с найденным Гаузе «тепловым повреждением» правых штаммов, бывших в его распоряжении. Возможным объяснением результатов Гаузе является предположение, что правые и левые штаммы, бывшие в его распоряжении, происходили из разных климатических зон, а именно правые штаммы были более северного происхождения, чем левые штаммы, а потому и дали наблюдавшуюся Гаузе разницу в своем отношении к температуре.

Учитывая наблюдения Мишустина и Букановой [7] и наши данные, нельзя признавать, что «тепловое повреждение» является свойством, связанным с инверсией направления загиба нитей колоний Bac. mycoides, как об этом пишет Гаузе.

Результаты опытов по выявлению ферментативной силы различных культур приведены в таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2

Рост колонии Вас. mycoides и степень разложения сахарозы (подкисление среды). Число крестов обозначает силу роста и степень подкисления среды

№ опыта	Дата (1945 г.)	t°	Культура	Степень роста колонии	Сила образования кислоты	Примечание
1	5.VII—7.VII	28	L_2	+	+	Посев D- и L-форм в разные чашки
			L_3	+	+	
			D_1	+++	+++	
			D_2	+++	+++	
2	6.VII—8.VII	23	L_2	+	++	Посев, как в опыте 1
			L_3	+	+	
			D_1	+++	+++	
			D_2	+	+	
3	8.VII—9.VII	28	L_1	++	+	Посев в одну чашку двух колоний L_1 и D_2 и в другую L_2 и D_1
			D_2	+++	++	
			L_2	+	0	
			D_1	+++	+++	
4	9.VII—10.VII	23	L_2		+	Посев, как в опыте 3
			D_2	+	+	
		25	L_2	+	++	
			D_2	+	++	
		29	L_2	-	+	
			D_2	+++	+++	
	10.VII—11.VII	23	L_3	+	+	Посев культур попарно в одну чашку L_3 с D_1 и L_2 с D_2
			D_1	++	++	
			L_2	+	+	
			D_2	+	+	
		25	L_3	+++	+++	
			D_3	+++	+++	
			L_2	+++	+++	
			D_2	++	+++	
		29	L_3	+	+	
			D_1	+++	+++	
			L_2	+	0	
				+++		

В табл. 4 сведены данные по корреляции энергии роста и силы подкисления среды с сахарозой. Выявляется вполне ясная закономерность: чем энергичнее рост формы, тем выше ее ферментативная активность. При этом наши правозавитые культуры в основном оказываются как более мощными по росту, так и по ферментативной активности. При испытании культур в разных температурах (20, 23 и 25°) как левые, так и правые культуры ведут себя, примерно, одинаково как в отношении роста, так и в смысле подкисления среды. Лишь при более высоких температурах (28, 29, 32 и 33°) правые культуры оказываются более мощными и по росту и по ферментативной деятельности.

Можно сделать вывод, что изученные два правых и два левых штамма из одной и той же местности показывают, что реакция Люиса отнюдь не является специфичной для левых штаммов, а, повидимому, связана как с условиями культивирования (температура), так и наследственной биохимической мощностью любого из инверсных штаммов.

Наши экспериментальные данные с левыми и правыми штаммами Вас. mycoides одинакового географического происхождения показывают, что «тепловое повреждение» Гаузе и отсутствие реакции Люиса

Таблица 3

Размеры колоний и сила фермента, разлагающего сахарозу. В чашке Петри производился посев L_3- и D_1-культур и в другие чашки L_2- и D_2-культур. Средний диаметр 4 колоний в мм

№ опыта	Дата (1946 г.)	t°	Культура	Диаметр колоний в мм	Сила образования кислоты	Примечание
1	22.II—23.II	23	L_2	10 5	+	
			L_3	8,2	+	Вокруг одной колонии желтизны нет
			D_1	5,5	+	Колония завилась налево. У двух желтизны нет
			D_2	4,2	+	
		25	L_2	15 5	+++	
			L_3	13,0	++	
			D_1	11,2	++	
			D_2	7,8	+	
		28	L_2	8,2	+	Почти нет желтизны
			L_3	9,5	++	
			D_1	14,2	++	
			D_2	11,0	++	
		32	L_2	3,0	+	У двух других колоний желтизны нет
			L_3	3 0	+	Желтизна только у одной колонии
			D_1	14 0	+++	
			D_2	14,5	+++	
		20	L_2	27 5	+	
			L_3	23 5	+	
			D_1	23 5	+	
			D_3	16 5	++	
		25	L_2	43,0	+++	
			L_3	36 5	+++	
			D_1	46 0	+++	
			D_3	43,5	++	
2	19.IV—21.IV	29	L_2	33,5	+	
			L_3	28 0	+++	
			D_1	60 0	+++	
			D_2	56,5	+++	
		33	L_2	15,0	0	
			L_3	12,5	+	
			D_1	47 5	+++	
			D_2	43,0	+++	

отнюдь не являются специфическим отличием мутантных правозавитых культур Bac. mycoides от более обычных левозавитых форм, как это считал Гаузе. Следовательно, отпадает заключение о связи морфологической инверсии колоний Bac. mycoides с молекулярной инверсией каких-то веществ, входящих в состав протоплазмы этих бактерий, высказанное Гаузе применительно к данным по температурной зависимости и ферментативной активности левых и правых форм Bac. mycoides

Интересно поставить все же вопрос о том, в какой мере Bac. mycoides вообще с его изомерией формы колоний может быть использован при обсуждении проблемы связи морфологической инверсии с молекулярной инверсией, впервые поставленной в биологии Ludwig [12]. Гаузе [4] подверг изучению пептидазу у гладких форм Bac. mycoides, происшедших в результате диссоциации от инверсных лево- и правозавитых

форм. Гаузе сообщил, что автолизат штамма, происшедшего от обычной левозавитой формы, не в состоянии расщеплять *d*-лейцил-глицин и *d*-лейцил-глицил-глицин, а автолизат из штамма, происшедшего из пра-

Таблица 4

Корреляция силы подкисления среды (сбраживание сахарозы с силой роста колоний; жирным шрифтом обозначены левозавитые колонии Bac. mycoides)

Сила подкисления	+	++	+++
+++		1	8+**2**
++	**1**	2+**1**	**1**
+	3+**8**	**1**	
0	**2**		

Сила роста

возавитого штамма, легко расщепляет эти необычные формы пептидов. Гаузе пишет, что «инверсная форма организма оказывается связанной с оптической инверсией его протеолитических ферментов». Это заключение не вполне строго, так как автолизаты готовились из бактерий, потерявших инверсию формы, каковая имелась лишь в прошлом у изучаемых культур.

Необходимо отметить, что авторам этой статьи удалось показать [1], что рост правозавитых штаммов Bac. mycoides окрестностей Севана (Армения) подавляется больше правым изомером акрихина, чем левым, что выражается в величине показателя действия изомеров, равной для правых штаммов 74,1%. Этот показатель получается из формулы $d / l \cdot 100$, где d — средний диаметр колоний на среде с *d*-акрихином, а l — на среде с *l*-акрихином. Рост же левозавитых штаммов окрестностей Севана подавляется левым изомером акрихина сильнее, чем правым, что выражает показатель, равный для левых культур 114,1%[1]. Если допустить, что отличия в реакции на левый и правый акрихин связаны с инверсией рецептора акрихина на молекулярном уровне, то эти опыты являются первым по времени доказательством связи морфологической инверсии бактериальной колонии с оптической инверсией молекул какого-то компонента протоплазмы — вероятнее всего, какого-нибудь фермента. Это делает дальнейшее изучение биохимии и физиологии левых и правых форм Bac. mycoides крайне перспективным.

Выводы

1. Опыты с правыми и левыми колониями Bac. mycoides Flügge из одной местности (культуры выделены из почв окрестностей оз. Севан, Армения) показали, что правые колонии не характеризуются явлением «теплового повреждения», описанным для правых колоний в работе Гаузе [8]. В нашем случае левые колонии дают более низкий темпера-

[1] В 1947 г. опыты 1945—1946 гг. с севанскими культурами были нами еще раз подтверждены.

турный оптимум роста, чем правые. В противоположность мнению Люиса [11] и Гаузе [8], в наших опытах правые колонии не отличались от левых по их ослабленной энзиматической деятельности при выращивании на среде с сахарозой.

2. Наблюдается определенная положительная зависимость между скоростью роста колонии и ферментативным использованием сахарозы. Это проявляется в пожелтении среды, изготовленной с добавлением фенол-красной краски.

3. Инверсные формы Bac. mycoides представляют исключительно интересный материал для изучения соотношения между морфологической инверсией и молекулярной инверсией каких-то молекул, входящих в состав протоплазмы. Это заключение основывается на присутствии *d*-пептидазы у правых форм Bac. mycoides (Гаузе [4]) и на специфичности реакции левых и правых колоний Bac. mycoides на оптические изомеры акрихина (Алпатов и Настюкова [1]).

Научно-исследовательский
институт зоологии
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Получено 27. V. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Алпатов В. В. и Настюкова О. К. О специфичности действия оптических изомеров акрихина на правую и левую форму Bac. mycoides Flügge. ДАН, т. 54, № 6, стр. 541, 1946.
2. Гаузе Г. Ф. Анализ некоторых физиологических свойств правозавитых и левозавитых форм Bac. mycoides. Микробиология, т. VII, стр. 529, 1938.
3. Гаузе Г. Ф. Асимметрия протоплазмы. Изд. Акад. Наук, М.—Л., 1940.
4. Гаузе Г. Ф. О *d*-пептидазе у левозавитых и правозавитых штаммов Bac. mycoides. Биохимия, т. 7, вып. 1—2, стр. 25, 1942.
5. Гаузе Г. Ф. и Смарагдова Н. П. Исследования над ростом дрожжевых клеток Torula utilis на оптических изомерах лейцина и валина. Биол. журн., т. 7, вып. 2, стр. 399, 1938.
6. Мишустин Е. Н. Географическая изменчивость почвенных бактерий. Усп. совр. биол., т. 22, вып. 3, стр. 387, 1946.
7. Мишустин Е. Н. и Буканова В. И. Об ориентации бактериальных нитей в колонии Bac. mycoides. Микробиология, т. XIV, вып. 2, стр. 86, 1945.
8. Gause G. F. Some physiological properties of dextral and sinistral forms in Bac. mycoides Flügge. Biol. Bull., v. 76, No. 3, p. 448, 1939.
9. Gause G. F. Optical activity and living matter, Normandi, Missouri USA, 1941.
10. Gersbach A. Ueber die Wendigkeit der Kolonieausläufer des Bac. mycoides («Isomerie» bei Bakterien), Ctbl. Bakt., Abt. I, Bd. 88, S. 97, 1922.
11. Lewis I. M. Secondary colonies of bacteria, J. Bact., v. 25, No. 4, p. 365, 1933.
12. Ludwig W. Rechts-Links Problem, Berlin, 1932.

ВЛИЯНИЕ РЕАКЦИИ СРЕДЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АЗОТФИКСАЦИИ И РОСТ АЗОТОБАКТЕРА

Г. Н. Блинков

Вопрос о влиянии кислотности на жизнедеятельность азотобактера изучался рядом исследователей. Gainey [8] установил, что в чистых культурах азотобактер может развиваться при pH не ниже 6,0—5,9, но в некоторых почвах жизнедеятельность азотобактера сохраняется даже при pH = 4,5. Войткевич и Рунов [3] тоже признают, что pH является одним из важных факторов, обусловливающих развитие азотобактера в почве. Burk с сотрудниками [7] выяснил, что на безазотистых средах азотобактер может развиваться только при pH не ниже 6; при наличии же связанного азота нижний предел реакции среды, при котором еще возможно развитие азотобактера, спускается до pH = 4,5 и даже ниже. Мишустин с Семенович и Бахаревой [5] установил, что азотобактер быстро инактивируется при внесении его в почву, имеющую солевое pH около 4—5. Виноградский [2, 9] считает pH одной из главных причин, обусловливающих выделение аммиака жизнедеятельными клетками азотобактера: в щелочной среде синтезируемый азотобактером аммиак не ассимилируется полностью и часть его выделяется наружу. Сильное влияние pH на выделение азотобактером аммиака установлено также Блинковым [1].

Главная цель данного исследования — выяснить, как влияет pH на интенсивность фиксации азота азотобактером.

Экспериментальная часть

Исследования проводились над тремя культурами азотобактера: Azotobacter agile, Az. vinelandii и Az. chroococcum. Первые две культуры были получены из Института микробиологии Академии Наук СССР, а последняя — недавно мной выделена из почвы окрестностей Томска.

В лабораторной практике обычно применяются для азотобактера среды с большим содержанием мела. Такие среды для этих моих исследований, разумеется, не подходят, поэтому была подобрана среда без мела следующего состава:

водопроводной воды	1 л
сернокислого кальция	1 г
сернокислого магния	0,5 »
фосфорно-двукалиевой соли	1 »
сахарозы	20 »

В такой среде азотобактер развивается ничуть не хуже, чем на средах с мелом. Для регулирования pH, вместо фосфорно-двукалиевой соли, употреблялась смесь одно- и двузамещенного фосфорнокислого калия в концентрации 1/15 моля. Выращивались культуры на кремнекислых (30 мл геля на чашку) и агаровых пластинках. Посев производился суспензией молодой культуры азотобактера, выращенного в пробирках на агаровой среде. На каждую пластинку вносилось по 1 мл суспензии, полученной путем смывания культуры из одной пробирки 30 мл стерильной водопроводной воды. После посева пластинки выдерживались в термостате при 27°.

Для исследования интенсивности азотфиксации у Az. vinelandii и Az. agile культура выращивалась на кремнекислых пластинках при pH от 6 до 8. Показателем интенсивности азотфиксации являлось количество азота, накопленного азотобактером за известный период времени: за 2,5, 4 и 5 суток. Азот определялся по Голубеву [4]. Перед анализами пластинки с культурой азотобактера высушивались; при этом во избежание потери аммиака они предварительно подкислялись 5 мл 0,1 *N* соляной кислоты. Высушенный гель тщательно растирался до состояния муки тонкого помола; такая мука и использовалась для анализа. Эти анализы проводились с четырехкратной повторностью в каждом варианте опыта. Одновременно азот определялся в контроле, т. е. в геле с пластинок, зафиксированных сразу после посева азотобактера. Для таблиц брались цифровые данные за вычетом контроля.

pH определялся электрометрически в начале опыта и перед анализами на азот. Для этого при каждом анализе бралось по две отдельные пластинки; при этом гель в них тщательно перемешивался и разбавлялся небольшим количеством дестиллированной воды.

В опытах с Az. agile, по некоторым вариантам, отводилось еще по две пластинки для определения содержания сахарозы, что давало показатели об интенсивности использования азотобактером энергетического материала. Вытяжка для этих анализов подготовлялась так же, как это практикуется в отношении сочных плодов и овощей (Церевитинов [6]). Определение сахара проводилось по Бертрану.

Средние данные всех указанных выше определений представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Влияние pH на интенсивность фиксации азота Azotobacter vinelandii

pH среды			Фиксировано азота в мг	
в начале опыта	через 2,5 суток	через 4 суток	за 2,5 суток	за 4 суток
6,09	6,07	6,11	1,25	4,15
6,48	6,52	6,49	3,21	4,68
6,97	6,99	7,02	4,54	5,35
7,13	7,11	—	4,98	—
7,22	7,23	—	5,30	—
7,33	7,34	7,30	5,45	5,48
7,46	7,45	—	5,47	—
7,58	7,61	7,63	5,43	5,46
7,87	7,83	—	5,40	—

Таблицы показывают, что pH в пределах каждого варианта остается постоянным на протяжении всего опыта. Выявляется, что в щелочной среде азотфиксация совершается гораздо интенсивнее, чем в кислой среде; например, за 2,5 суток при pH = 7,3 азота накапливается в четыре с лишним раза больше, чем при pH = 6,1—6,2. В течение 2,5 суток при pH = 7,3 накапливается уже предельное для данных условий количество азота, а при pH = 6,1—6,2 азотфиксация заканчивается лишь через 5 суток. Как видно из табл. 2, накопление азота находится в соответствии с потреблением сахара: при pH = 7,3 весь сахар расходуется за 2,5 суток, а при pH = 6,1—6,2 только через 5 суток. Зависимость между pH и интенсивностью азотфиксации не прямо пропорциональная: по мере повышения pH ускорение азотфиксации постепенно уменьшается и прекращается при слабощелочной реакции, приблизи-

Таблица 2

Влияние pH на интенсивность фиксации азота Azotobacter agile

pH среды			Фиксировано азота в мг		Содержание сахарозы в мг		
в начале опыта	через 2,5 суток	через 4 суток	за 2,5 суток	за 5 суток	в начале опыта	через 2,5 суток	через 5 суток
6,10	6,14	6,18	1,35	5,92	600	495	Следы
6,66	6,66	6,70	3,38	5,96	600	250	Нет
6,97	7,00	—	4,42	—	—	—	—
7,28	7,28	7,32	5,98	5,90	600	Нет	—
7,50	7,48	—	5,89	—	—	—	—
7,72	7,72	—	6,02	—	—	—	—
7,92	7,96	7,93	5,86	5,95	600	Следы	—

тельно при pH = 7,3. В пределах pH = 7,3—8,0 интенсивность азотфиксации остается на одном уровне.

По установившемуся взгляду, параллельно с азотфиксацией идет и рост азотобактера, так как усваиваемый азот используется прежде всего для построения органических веществ клеток самого азотфиксатора. Поэтому вполне очевидно, что и влияние pH, резко проявляющееся в отношении азотфиксации, должно в равной мере сказываться также и на росте азотобактера, о чем можно легко судить по накоплению сухого вещества. При проверке такое предположение вполне подтвердилось. В этих исследованиях культура азотобактера выращивалась на агаровых пластинках с указанной выше средой. В возрасте 2,5 и 5 суток она смывалась небольшим количеством воды на часовые стекла и высушивалась в сушильном шкафу. Сухая масса взвешивалась. Опыт проводился с пятикратной повторностью в пределах каждого варианта; pH определялся электрометрически, и для этого брались отдельные пластинки, по две на анализ из каждого варианта. Для определения pH культура в пластинках заливалась 15 мл дестиллированной воды, с которой настаивалась в течение суток. Настой смывался в бюксы, в

Таблица 3

Влияние pH на рост Azotobacter agile

pH среды			Накопление азотобактером сухой массы в мг	
в начале опыта	через 2,5 суток	через 5 суток	за 2,5 суток	за 5 суток
6,10	6,08	6,12	23	116
6,57	6,60	6,58	60	123
7,20	7,23	—	117	—
7,31	7,34	7,35	124	127
7,69	7,69	7,73	119	125
7,93	7,91	—	121	—

которых и велось определение. В этих опытах, как и в предыдущих, использованы культура Az. vinelandii и Az. agile. Средние данные приводятся в таблицах 3 и 4.

Сравнивая накопление сухого вещества при разном pH, мы видим, что в кислой среде оно вначале резко отстает по сравнению со щелоч-

Таблица 4

Влияние pH на рост Azotobacter vinelandii

pH среды			Накоплено азотобактором сухой массы в мг	
в начале опыта	через 2,5 суток	через 5 суток	за 2,5 суток	за 5 суток
6,12	6,14	6,13	27	102
7,15	7,18	7,19	92	110
7,31	7,34	7,32	108	114
7,68	7,66	7,70	107	112
7,95	7,94	7,97	111	113

ной средой: в щелочной среде за 2,5 суток накапливается уже предельное количество сухого вещества, в то время как в кислой среде оно достигает этой нормы лишь через пять суток. Как и в процессе азотфиксации, в процессе накопления органического вещества максимальная скорость устанавливается около pH = 7,3 и остается на этом уровне до pH = 8.

В моих опытах был вариант и с более щелочной средой, где pH по теоретическим расчетам должен быть около 9. В этом варианте развитие азотобактера шло с такой же интенсивностью, как и в других щелочных вариантах. Однако pH в этом варианте из-за технических трудностей не определялся; поэтому и данные в таблицах не приводятся.

Для исследований Az. chroococcum культура выращивалась только на агаровых пластинках. Через 2,5 и 5 суток культура смывалась и в ней определялся общий азот и сухое вещество. Результаты опытов приводятся в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что в поведении Az. chroococcum в зависимости от pH и по интенсивности азотфиксации и по интенсивности роста на-

Таблица 5

Влияние pH на рост и интенсивность азотфиксации Azotobacter chroococcum

pH среды			Накоплено азотобактером сухой массы в мг		Фиксировано азота в мг	
в начале опыта	через 2,5 суток	через 5 суток	за 2,5 суток	за 5 суток	за 2,5 суток	за 5 суток
6,18	6,20	6,22	35	91	1,72	3,97
7,15	7,17	7,18	83	—	3,65	—
7,33	7,35	7,36	100	104	4,26	4,20
7,79	7,79	7,82	97	102	4,13	4,17

блюдаются те же закономерности, которые выше были отмечены в отношении Az. vinelandii и Az. agile.

В заключение следует отметить, что во всех моих опытах разница в интенсивности развития культуры на кислой и щелочной среде была настолько резкой, что она бросалась в глаза даже при беглом осмотре. В опытах с Az. chroococcum эта разница особенно ярко проявлялась благодаря пигментации, которая в щелочной среде начиналась уже на третьи сутки, а в кислой — только на шестые сутки.

Выводы

1. На процесс азотфиксации и использование азотобактером энергетического материала pH оказывает большое влияние: в слабощелочной среде эти процессы протекают гораздо интенсивнее, чем в кислой среде (при pH = 6).

2. Зависимость между подщелачиванием и повышением интенсивности азотфиксации не прямо пропорциональная: по мере подщелачивания кислых сред возрастание интенсивности азотфиксации постепенно замедляется и прекращается при слабощелочной реакции, примерно при pH = 7,3.

3. В пределах от pH = 7,3 и, по крайней мере, до pH = 8 интенсивность азотфиксации сохраняется на одинаково высоком уровне; в этих пределах pH и интенсивность использования энергетического материала находится на одинаковом уровне.

4. В зависимости от pH в полном соответствии с азотфиксацией находится и рост азотобактера: в пределах pH = 6,0—7,3 рост ускоряется, а при дальнейшем подщелачивании, по крайней мере до pH = 8, он остается на достигнутом уровне.

Кафедра ботаники
Томского педагогического института

Получено 28. VIII. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинков Г. Н. О выделении аммиака азотобактером. Микробиология, т. XVI, вып. 2, стр. 113, 1947.
2. Виноградский С. П. Метод почвенной микробиологии, примененный при изучении азотобактера и нитрифицирующих бактерий. Успехи биологической химии, вып. XIII, стр. 18, 1937.
3. Войткевич А. Ф. и Рунов Е. В. О распространении азотобактера в почве. Вестник бактериолого-агрономической станции НКЗ, № 25, стр. 58, 1928.
4. Голубев И. Ф. Новый метод определения общего азота в почвах и торфах. Почвоведение, № 10, стр. 1489, 1937.
5. Мишустин Е. Н. Почвенная кислотность как фактор, определяющий появление в почве неактивного азотобактера. Микробиология, т. VIII, вып. 1, стр. 19, 1939; т. VIII, вып. 9—10, стр. 1063, 1940.
6. Церевитинов Ф. В. Химия свежих плодов и овощей, Москва, 1933.
7. Burk D., Lineweaver N. and Horner G. The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by Azotobacter. J. Bact., v. 27, No. 4, p. 325, 1934.
8. Gainey P. L. Soil reaction and the growth of Azotobacter. J. Agric. Res., v. XIV, p. 265, 1918; v. XXIV, p. 765, 1923.
9. Winogradsky S. Sur la synthèse de l'ammoniaque par les Azotobacter. Ann. Inst. Past., v. 48, 269, 1932.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ГРЯЗЕВЫХ ВУЛКАНАХ «АХТАНИЗОВСКИЕ БЛЕВАКО»

М. А. Мессинева

Интерес к изучению биохимических свойств сопочных грязей объясняется тем, что выделения действующих грязевых вулканов всегда содержат значительные количества органических веществ. Состав выделяющихся при извержении газов говорит в пользу биогенного их происхождения (до 90% CH_4). Температура в глубине грязевого вулкана никогда не бывает слишком высокой, даже в тех случаях, когда наблюдается загорание выделяющихся из кратера газов [1, 3].

На биохимический характер процессов, происходящих в недрах грязевых сопок, впервые указал Омелянский, относивший выделение метана к результатам анаэробного разложения органических веществ в недрах вулканов. Эта мысль в дальнейшем подтвердилась экспериментальными работами.

Таусон и ряд его сотрудников [8] исследовали грязевые выделения 10 различных групп сопок, описали микрофлору сопочной брекчии и отметили большое сходство условий развития микроорганизмов в сопках с условиями образования нефтематеринских пород.

Рубенчик [7] определил в сопочной грязи Ахтала общее содержание микроорганизмов, а также произвел учет различных физиологических групп, в том числе анаэробных бактерий.

Наибольшее количество микробов содержали поверхностные грязи, с глубиной количество микроорганизмов снижалось. Рубенчик объясняет это явление проникновением микроорганизмов из воздуха и из почвы.

В прямом противоречии с результатами Рубенчика находятся выводы Гинзбург-Карагичевой [2], которая, однако, производила исследования других объектов. Гинзбург-Карагичева утверждает, что количественное содержание бактерий возрастает с глубиной, на поверхности же грифона бактерий меньше. В геологических процессах, происходящих при образовании грязевых вулканов, по мнению Гинзбург-Карагичевой, ведущая роль принадлежит бактериям, а сами грязевые вулканы тесно связаны с имеющимися в тех же районах выходами нефти.

В 1939 г. комплексная экспедиция Института горючих ископаемых АН СССР при участии автора настоящей работы обследовала два грязевых вулкана «Ахтанизовские Блевако».

Большая и Малая Ахтанизовские Блевако расположены на антиклинальной складке, которая тянется через Таманский полуостров от станицы Сенной до станицы Ахтанизовской, и представляют собой активнодействующие сопки.

Доступ к кратеру Малой Блевако был затруднен свежевыброшенной грязью и вследствие этого для анализа был взят образец свежевыброшенной брекчии с дневной поверхности.

Из кратера Большой Блевако в момент взятия пробы выделялись только газы. Пробы были взяты буром Гиллера с глубины 200 см в стерилизованную посуду.

Во время отбора проб было определено содержание микроорганизмов в воздухе над вулканами, для этого использовали открывание чашки Петри на 5 минут. Во время работы над сопкой был довольно

сильный ветер и количественное содержание микроорганизмов, особенно плесневых грибов, оказалось значительным.

Вариант опыта	Общее число микроорганизмов	Из них	
		бактерий	грибов
До работы	1 690	91	1 559
После окончания бурения	1 053	124	929

Отсюда можно видеть, что предположение Рубенчика о возможности попадания бактерий в грязевые сопки извне вполне вероятно. В дальнейшем интенсивное развитие микрофлоры на поверхности несомненно окажет влияние и на активность анаэробного населения в недрах вулкана.

Общая характеристика взятых образцов сопочной брекчии приведена в табл. 1.

Таблица 1

Описание образца	pH*	Eh*	rH*	Влажность, %	Содержание золы, %	Органическое вещество, %	Содержание железа, мг/г
Буровато-серый вязкий ил с дневной поверхности Малой Блевако .	7,9	—512	14,3	68,60	86,13	13,87	42,6
Темносерая вязкая, довольно плотная грязь из кратера Большой Блевако с глубины 200 см	7,9	—204	9,0	42,28	86,81	13,19	41,7

* Определения Eh, pH и rH были произведены проф. С. Н. Скадовским, которому приношу искреннюю благодарность.

Содержание органического вещества, как можно видеть из таблицы, невелико. Окислительно-восстановительный потенциал отрицательный, реакция среды слабощелочная. Повидимому, вследствие этого плесневые грибы не развиваются на свежевыброшенной грязи, несмотря на значительное содержание их в воздухе. Бактерии же, напротив, как показывает их учет, проведенный по Хильтнеру, представлены разнообразными физиологическими группами (табл. 2).

Общее содержание гетеротрофных бактерий в поверхностной грязи больше, чем в глубине грифона. Содержание пигментных форм также в поверхностной пробе выше. Интересно отметить присутствие в пробах поверхностной грязи такого типично-почвенного микроорганизма, как Bac. mycoides, характерные колонии которого можно было наблюдать на МПА.

Разложение белковых веществ (пептон, казеин) с образованием газов (среда Selter) под влиянием микрофлоры сопочной грязи происходило очень интенсивно и обычно сопровождалось образованием черного осадка на дне бродильной трубки.

Почти так же интенсивно проходило и развитие денитрификаторов, которые учитывались на среде van Iterson. Разложение клетчатки в поверхностном образце было очень слабым, тогда как глубинный образец показывал интенсивное разложение клетчатки в анаэробных условиях. Учет бактерий, разлагающих жир, производился на питательной среде

Таблица 2

Образец	Аэробы на МПА (тыс. на 1 г)			Бактерии, разлагающие белок с образованием газов	Денитрификаторы	Разлагающие клетчатку		Разлагающие жир		Десульфурирующие
	общее число	пигментные	спороносные			аэробы	анаэробы	аэробы	анаэробы	
Поверхностная грязь	650 154	247 677	12 383	309	31 000	—	Единичны	300	309	2 064
Грязь с глубины 200 см .	234 079	137 693	Нет	5 739	172000	—	Интенсивное разрушение клетчатки	5 000	11 474	11 474

следующего состава: вода Ахтанизовского лимана — 1 000 мл, K_2HPO_4 — 5 г, $(NH_4)_2HPO_4$ — 5 г, $MgSO_4$ — 1,0 г, оливковое масло — по 2 мл в каждую колбочку.

Липолитические бактерии были представлены главным образом анаэробными формами.

Десульфурирующие бактерии (среда van Delden) составляли до 11 тысяч в 1 г грязи. Процесс десульфуризации при добавлении небольшого количества сульфатов к сопочной грязи шел очень интенсивно, H_2S образовывался уже на 2—3-й день.

Сопочная грязь в значительном количестве содержала и автотрофных бактерий из группы тионовокислых [4]. Отсюда следует, что снижение rH до 9 для них не является губительным, однако проявление их физиологической активности может и не иметь места.

В дополнение к изучению живой микрофлоры сопочной грязи было произведено испытание ее ферментативной активности. Методы обнаружения активности ферментов описаны в работах по исследованию ферментов в иловых отложениях [5, 6].

Результаты определений приведены в табл. 3.

Таблица 3

Фермент	Малая Блевако	Большая Блевако
Тирозиназа	—	—
Оксидаза (лакказа)	—	—
Пероксидаза	—	—
Каталаза	+	+
Редуктаза	—	+
Амилаза	—	+
Химозин	—	—
Протеиназа	+	+

Сопочная грязь Малой Блевако содержала активную каталазу и протеиназу. Большая Блевако — каталазу, редуктазу, амилазу и протеиназу.

Весьма вероятно, что другие ферменты инактивируются боратами и иодидами сопочной грязи, но, может быть, отрицательные результаты являются следствием больших методических трудностей в их определении.

Выводы

Возможно, что биохимические процессы при возникновении грязевых вулканов происходят за счет жизнедеятельности анаэробной микрофлоры, проникающей с пластовыми водами. Однако в существующих грязевых вулканах активно развиваются аэробные как гетеротрофные, так и автотрофные микроорганизмы. Сопочная брекчия, выброшенная на дневную поверхность, быстро заселяется почвенной или воздушной микрофлорой, продолжающей минерализацию органического вещества брекчии. Постепенно проникая в глубь грифона, аэробная микрофлора оказывает влияние и на процессы, происходящие в самом грифоне. Биохимические превращения органических и минеральных веществ в грязевых вулканах, в значительной степени могут также осуществляться за счет активности свободных ферментов.

Институт горючих ископаемых
Академии Наук СССР
Москва

Получено 8.VIII.1946

ЛИТЕРАТУРА

1. Архангельский А. Д. Несколько слов о генезисе грязевых вулканов Апшеронского полуострова и Керченско-Таманской области. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы, Отд. геол., т. III, 1925.
2. Гинзбург-Карагичева Т. Л., Вегер Р. А., Осницкая Л. К., Гаркина И. Р., Тимофеева А. Г., Грингауз П. С. Материалы по микробиологии грязевых вулканов Крымско-Кавказской геологической провинции. Сб. по исследованию грязевых вулканов. Изд. АН СССР, 1939.
3. Губкин И. М. Обзор геологических образований Таманского полуострова. Изв. Геол. Ком., т. XXX, вып. II, 1913.
4. Мессинева М. А. Количественный учет тионовокислых бактерий в отложениях лиманов и сопочных грязях. Микробиология, т. XV, стр. 129, 1946.
5. Мессинева М. А. Ферментативные свойства пресноводных илов. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы, Отд. биологии, т. 12, 1946.
6. Мессинева М. А. Активные ферменты в иловых отложениях озер Залучья. Тр. Лаборатории генезиса сапропеля, вып. 2, 1946.
7. Рубенчик Л. И. К микробиологии сопочных грязей. Микробиология, т. V, вып. 4, 1936.
8. Таусон В. О., Веселов И. Я., Алешин В. И. и Гольдин М. И. Об анаэробной микрофлоре сопочных грязей. Микробиология, т. II, вып. 4, 1933.

PSEUDOMONAS AURANTIACA nov. sp.

М. И. Нахимовская

Род Pseudomonas охватывает различные, широко распространенные в природе виды тонких, аэробных, подвижных, бесспоровых палочек. Все представители этого рода обладают общей хромогенной функцией: они продуцируют зеленый пигмент — бактериофлуоресцин, который окрашивает питательную среду.

Известны два двухпигментных вида Pseudomonas, которые образуют наряду с бактериофлуоресцином еще один пигмент: 1) Ps. pyocyanea (палочка синего гноя) — синий пигмент, растворимый в хлороформе, пиоцианин [1]; 2) Ps. syncyanea (палочка синего молока) — голубовато-стальной пигмент, не растворимый в хлороформе.

Нам удалось выделить из образцов почв Еревана еще один двухпигментный вид Pseudomonas, не описанный до сих пор в литературе. Этот микроорганизм продуцирует второй пигмент от морковно-желтого до золотисто-медного оттенка.

На МПА колонии этого организма уже через 24 часа были интенсивно окрашены в красновато-желтый или оранжевый цвет, агар окрашен в зеленый цвет, типичный для бактериофлуоресцина, и лишь у самого бактериального штриха ясно выступала оранжевая окраска.

Через 48 часов оранжевый пигмент, диффундируя в агар, маскировал зеленый, окрашивая агар в характерный красновато-оранжевый цвет с зеленоватым оттенком.

На МПБ тонкая пленка окрашивалась через 24 часа в оранжево-желтый цвет, а бульон — в желтовато-зеленый цвет, который постепенно терял зеленый оттенок и переходил в типичный для этой культуры морковно-желтый.

В некоторых пробирках пигментообразование шло так же, как на МПА, т. е. зеленый пигмент появлялся быстрее и уже через 24 часа окрашивал почти весь бульон. Оранжевый пигмент медленно диффундировал из-под пленки, маскируя зеленый.

После 2—3 пересевов мы заметили в некоторых пробирках изменение в окраске: на МПА бактериальный налет превратился вначале в бледножелтый, а потом и совершенно бесцветный (слабожелтая окраска сохранялась иногда только в центре штриха). Агар потерял свою характерную окраску свежей моркови и стал желтовато-зеленым. Такие культуры имели характерный вид Ps. fluorescens. МПБ также стал окрашиваться или в желто-зеленый или яркозеленый цвет.

Измененные культуры были рассеяны на пластинки МПА. Во всех случаях вырастали два типа колоний: 1) типичные золотисто-оранжевые и 2) совершенно бесцветные. Часто встречались и колонии переходного

---

[1] Некоторые исследователи описывают у Ps. pyocyanea третий пигмент красного цвета. Однако, большинство исследователей считают красный пигмент продуктом окисления пиоцианина.

типа, у которых окраска сохранялась в центре колоний, оставляя бесцветными края колоний различной ширины [2].

В соответствии с описанными колониями были получены два типа культур: 1) оранжевый бактериальный налет, продуцирующий морковно-желтый и зеленый пигменты, т. е. двухпигментный тип, и 2) бесцветный налет, выделяющий один пигмент — зеленый, окрашивающий питательную среду в зеленый цвет, характерный для Ps. fluorescens, т. е. однопигментный тип.

Наблюдения за пигментообразованием показали, что однопигментные формы в дальнейшем никогда не превращались в двухпигментные, никогда не восстанавливали утраченную оранжевую окраску.

Двухпигментные формы через несколько пересевов обычно теряли свою оранжевую окраску, становились бесцветными, сохраняя в питательной среде только один зеленый пигмент. Рассев двухпигментных культур на пластинки МПА всегда вновь показывал появление большого количества бесцветных флуоресцирующих колоний.

Чтобы сохранить яркооранжевую культуру, нам приходилось время от времени рассевать ее на агаровые пластинки и вновь выделять ее из одной оранжевой колонии.

Своеобразная двойная пигментация выделенной культуры привлекла наше внимание и поставила перед нами следующий вопрос: не является ли выделенный нами микроорганизм новым, еще не описанным, двухпигментным видом Pseudomonas, который продуцирует два пигмента: зеленый — бактериофлуоресцин, характерный для всей группы Pseudomonas, а другой — оранжевый, который специфичен только для выделенного нами вида?

Отщепление однопигментных флуоресцирующих вариантов говорило в пользу нашего предположения, так как подобное явление хорошо известно для Ps. ruosuanea, у которого многочисленными исследователями описана потеря специфической синей окраски и отщепление вариантов типа Ps. fluorescens.

Было, однако, одно возражение: возможно, что мы имеем дело не с чистой культурой, а со смесью двух видов, из которых один выделяет оранжевый, а другой — зеленый пигмент.

Чтобы окончательно отбросить это возражение, надо было выделить оранжевую культуру из одной клетки и изучить пигментообразование у такой одноклеточной культуры.

Для выделения из одной клетки мы взяли шестнадцатичасовую культуру и, пользуясь методом «висячих капель», выделили две одноклеточные культуры, которые давали замедленный рост, но ничем не отличались от исходной культуры, описанной выше. В них также ясно выступало наличие двух пигментов: зеленого бактериофлуоресцина, который появлялся раньше, и оранжево-морковного, который постепенно вытеснял зеленый. После нескольких пересевов они также дали начало однопигментным флуоресцирующим культурам, ничем не отличимым по внешнему виду от Ps. fluorescens.

Таким образом, мы несомненно имели не смесь двух морфологически близких видов, трудно разделимых обычными бактериологическими методами, а чистую культуру двухпигментного вида Pseudomonas, который, кроме флуоресцина, общего для всего рода, продуцирует специфический пигмент от оранжево-морковного до золотистого цвета. Этот организм был назван нами Ps. aurantiaca nov. sp.

---

[2] Одновременно с изменением в пигментообразовании мы наблюдали и изменения в характере роста выделенной культуры. Блестящий влажный налет с гладкой поверхностью превращался в матовый сухой со слегка складчатой поверхностью. При рассевах на МПА среди бесцветных и пигментированных колоний были обнаружены сухие складчатые колонии с изрезанными краями, типичные R-формы.

Морфология и характер роста Ps. aurantiaca

Микроорганизм	Питательная среда		
	МПА	МПБ	МПЖ
Двухпигментный тип	Штрих: влажный оранжевый с гладкой поверхностью. Агар окрашен в зеленовато-оранжевый, позже морковно-оранжевый цвет Колония: круглая оранжевая с гладкой поверхностью и ровными краями. Часто происходит отщепление R-вариантов сухих, морщинистых, с характерной оранжевой окраской	Муть. Тонкая пленка. Пленка и осадок окрашены в желтый цвет. Питательная среда желтовато-зеленая, позже морковно-желтая R-варианты образуют на бульоне ноздреватую, морщинистую плотную пленку с последующим появлением мути	Оранжевый налет. Кратеровидное разжижение через 48—72 часа
Однопигментный флуоресцирующий вариант (типа Ps. fluorescens)	Штрих: неокрашенный, влажный, гладкий. Среда окрашена в зеленый цвет, характерный для бактериофлуоресцина Колония: неокрашенная, гладкая с ровными крями. Часто отщепляются сухие морщинистые R-варианты, с диффундирующим в среду флуоресцирующим пигментом	Муть. Тонкая пленка. Осадок не окрашен. Среда окрашена в зеленый цвет R-варианты образуют плотную морщинистую пленку с последующим образованием мути. Среда окрашена в зеленоватый цвет	Грязнобелый налет. Разжижения нет (иногда появляется через месяц)

* В среде Эшби маннит заменен глюкозой.

Таблица 1

на питательных средах

Питательная среда				Восстановление NO_3	Морфология
Среда Эшби *	Среда Эшби+пептон	Картофель	Молоко		
Бесцветный, прозрачный студенистый рост, напоминающий капли клейстера	Обильный оранжево-золотистый налет с металлическим блеском Пигмент интенсивно выделяется в питательную среду, иногда откладывается на расстоянии 1—3 см от штриха в виде небольших скоплений с медно-металлическим блеском	Грязноораншевый блестящий налет	Пептонизацня через 48—72 ч.	+	Бесспоровая аэробная грам - отрицательная палочка различной длины (0,3 — 0,5 μ × × 0,8—2,0 μ) Подвижная. Лофотрих. 4—6 жгутов на одном конце
То же	Неокрашенный налет	Грязно-белый налет	Изменений нет	+	То же

Морфология и физиология Ps. aurantiaca nov. sp.

В таблицах 1 и 2 мы приводим подробную характеристику выделенного нами вида и полученного от него однопигментного варианта.

Таблица 2

Отношение Ps. aurantiaca к различным углеводам

Углеводы	Микроорганизм	
	Двухпигментный тип Ps. aurantiaca	Однопигментный вариант
Арабиноза	+ К	+ К
Ксилоза	+ К	+ К
Глюкоза	+ К	+ К
Галактоза	+ К	+ К
Сахароза	+ К	+ К
Мальтоза	—	—
Лактоза	—	—
Раффиноза	+ К	+ К
Глицерин	+ К	+ К
Дульцит	Нет роста	Нет роста
Маннит	+ К	+ К
Крахмал	Слабый рост, гидролиза нет	Слабый рост, гидролиза нет

К — Кислотообразование

Как видно из этих таблиц, выделенный нами организм представляет собой типичную для рода Pseudomonas подвижную, бесспоровую палочку 0,3—0,5 $\mu \times$ 0,8—2 μ. Он очень активен в отношении к различным углеводам, не сбраживает только лактозу и мальтозу, не гидролизует крахмал и не растет на дульците. Он мало требователен к источнику

азота. Пептон, аспарагин, лейцин, гликокколь, триптофан, аммонийные соли яблочной, янтарной и молочной кислот могут служить источником азота.

Заслуживает внимания рост на безазотистой среде Эшби. Повидимому, он является олигонитрофилом и довольствуется теми следами азота, которые содержатся как примеси в составных элементах этой питательной среды. Это свойство не является исключительным для этого организма, так как и другие виды Pseudomonas способны расти на этой безазотистой среде в виде слизистых колоний, что иногда является причиной ошибок при подсчете азотобактера в почве (Рыбалкина) [3].

Не все источники азота и углерода, пригодные для роста Pseudomonas, создают одинаковые условия для пигментообразования. Образование оранжевого пигмента происходит лучше всего при наличии глюкозы и несколько хуже — сахарозы, глицерина и маннита как источника углерода и аспарагина, $(NH_4)_2HPO_4$ и пептона — как источника азота.

Зеленый пигмент лучше всего образуется при наличии глюкозы и аспарагина. Некоторые сорта пептона угнетают флуоресценцию.

Чрезвычайно характерно пигментообразование на среде Эшби с пептоном, на которой происходит очень интенсивное образование только оранжевомедного пигмента, который иногда откладывается в питательной среде в виде мелких зернистых скоплений, на некотором расстоянии от колонии.

Сравнение физиологических и морфологических свойств однопигментного варианта с исходным двухпигментным (табл. 1) показывает, что параллельно с тем, как теряется способность продуцировать оранжевый пигмент, происходит инактивация протеолитического фермента: однопигментный вариант не разжижает желатину (или разжижает через месяц) и не изменяет молоко в то время, как исходный двухпигментный организм обладает высокой протеолитической активностью, полностью разжижает желатину через 24—72 часа и так же быстро пептонизирует молоко.

Выяснение той связи, которая существует между наличием оранжевого пигмента и активностью протеолитического фермента, представляет несомненный интерес, так как это поможет понять биологическое значение этого пигмента.

Оранжевый пигмент нерастворим в хлороформе, эфире, ацетоне, бензине. Он растворим в воде, в амиловом и этиловом спиртах. В кислой среде пигмент зеленеет, в щелочной — принимает красный оттенок.

Зеленый пигмент, в отличие от оранжевого, обесцвечивается кислотой и становится более интенсивным в щелочной среде. Эти свойства зеленого пигмента вполне совпадают с теми данными, которые приводят другие исследователи для бактериофлуоресцина.

Перед нами естественно возник вопрос о родстве между нашим микроорганизмом и Ps. fluorescens. Подобный вопрос был давно поставлен различными исследователями в отношении Ps. ruosyanea, и в ряде работ мы встречаем предположения, что Ps. fluorescens — это, повидимому, Ps. ruosyanea, который потерял синий пигмент. Все попытки как-либо отличить однопигментный зеленый вариант Ps. ruosyanea от Ps. fluorescens по биохимическим и морфологическим признакам (например количество жгутов) либо терпели неудачу, либо не могли убедить в том, что перед нами два разных вида. Данные же, полученные различными исследователями при помощи серологического метода, свидетельствовали о различной антигенной структуре этих видов, и потому те исследователи, которые применяли серологический метод, отрицали родство между ними.

---

[3] Неопубликованные данные.

Сравнение морфологических и физиологических признаков Ps. fluorescens и Ps. aurantiaca не дало и нам достаточно веских указаний для решения этого вопроса. Зеленый вариант был вполне идентичен с некоторыми представителями Ps. fluorescens. Серологический же метод подтвердил то, что было известно и для Ps. pyocyanea.

Два кролика иммунизировались взвесью Ps. aurantiaca. Сыворотка этих кроликов титр (8 000 и 6 400) применялась для агглютинации различных видов Pseudomonas: Ps. pyocyanea — 5 культур, Ps. fluorescens liq.— 9 культур, Ps. fluorescens non liq.— 1 культура [4] и 45 культур Pseudomonas, выделенных из различных источников (почва, вода, торф).

Ни один из взятых нами видов не агглютинировался сывороткой Ps. aurantiaca, и только зеленый однопигментный вариант дал агглютинацию до полного титра.

Следовательно, и по нашим данным, серологическим методом нельзя установить родственную связь между вариантом Ps. aurantiaca и каким-либо видом Pseudomonas.

Эти данные не могут, однако, считаться достаточными для решения вопроса в отрицательном смысле, так как известно, что иногда в пределах одного и того же вида одни культуры не агглютинируются иммунной сывороткой других (например B. coli).

Вопрос о той филогенетической связи, которая существует между двухпигментными и типичными однопигментными видами Pseudomonas, остается до сих пор неясным.

Было бы неправильно и упрощенно сводить все разнообразие видов Pseudomonas к однопигментным вариантам различных двухпигментных видов, потерявших способность продуцировать второй пигмент (синий, оранжевый). Однако некоторые представители Pseudomonas несомненно генетически связаны с этими двухпигментными видами, в частности и с Ps. aurantiaca, и, возможно, являются его однопигментным вариантом.

Диагноз Ps. aurantiaca

Клетки Ps. aurantiaca палочковидные 0,8—2 μ × 0,3—0,5 μ, подвижные, лофотрих, по 4—6 жгутиков на концах. Ps. aurantiaca продуцирует два пигмента: оранжевый и зеленый. Флуоресцирует. Оба пигмента диффундируют в субстрат, окрашивая его в соответствующий цвет. Колония окрашена в оранжевый цвет. В некоторых случаях колония окрашена в оранжевый цвет, субстрат — в зеленый. Легко образует однопигментный вариант с бесцветными колониями и зеленой окраской субстрата. Культуры быстро разжижают желатину, пептонизируют молоко без коагуляции. Хорошо усваивают различные углеводы, не разлагают крахмал. Хорошо растут на белковых и небелковых синтетических средах, легко усваивают неорганические формы азота (NH_3, NO_3), аминокислоты, пептон. Олигонитрофил. Аэроб. Оптимум 25°.

Выводы

1. Выделен не описанный до сих пор новый вид Pseudomonas, продуцирующий два пигмента: зеленый и золотистооранжевый. Оранжевый пигмент не растворим в эфире, ацетоне, хлороформе и бензине и растворим в воде, амиловом и этиловом спиртах.

---

[4] Все культуры Ps. fluorescens были получены из музея живых культур Института сельскохозяйственной микробиологии.

2. Образование двух указанных пигментов установлено в культурах, выделенных из одной клетки. Одноклеточные культуры отщепляли, подобно исходным, зеленые варианты, потерявшие способность продуцировать оранжевый пигмент. Эти варианты не отличимы от Ps. fluorescens.

3. Утрата способности к образованию оранжевого пигмента связана с инактивацией протеолитического фермента. Однопигментные зеленые варианты в отличие от двухпигментных не разжижают желатину и не пептонизируют молоко.

4. Серологическим методом не установлено родство между выделенной культурой и другими видами Pseudomonas. Сыворотка кролика, иммунизированного выделенной двухпигментной культурой, не агглютинировала ни одного из испытанных нами видов Pseudomonas. Зеленый однопигментный вариант агглютинировался той же сывороткой до полного титра.

5. Описанный организм рассматривается как новый вид, и мы предлагаем назвать его Pseudomonas aurantiaca.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 30. VI. 1947

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ СУХИХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ «РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ» И СУШКИ В ВАКУУМЕ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Н. И. Гамова-Каюкова

Сухие «культурные» закваски широко применяются при производстве кислосливочного масла, сыра и кисломолочных продуктов как в СССР, так и за границей.

Качество же их чрезвычайно лабильно; последнее зависит не только от перманентного подбора и культивирования производственно-ценных рас молочнокислых и ароматобразующих бактерий, но и от весьма ответственной операции массового размножения отобранных культур и перевода их в состояние анабиоза.

Практически техника приготовления сухих культур в СССР производится по методу Королева с добавлением сычуга, хлористого кальция и крахмала [7] или в последующей модификации Скородумовой [10], которая предложила высушивать только «микробный сгусток».

Дальнейшие работы в СССР по улучшению техники сушки заквасок велись по проверке или усовершенствованию способов высушивания закваски при высоких температурах.

При сравнительном изучении разных способов получения сухих культур лучшие результаты были получены Гибшман [2, 3] в вакуумаппарате при температуре около 40° и вакууме 5—10 мм ртутного столба. В этой работе имеются также указания относительно проведенной ориентировочной сушки закваски при низких температурах — по методу Титова при 10°.

Подробного анализа этого метода и более углубленных исследований произведено не было.

В настоящее время имеется не только большое количество исследований, посвященных методу сушки разнообразных микробов в вакууме после предварительного замораживания [11, 12, 13, 14, 16, 19], но и выпущена специальная аппаратура.

По методу Титова — Ярмольчука и Долинова высушены разнообразные микробы: патогенные и сапрофиты, вирусы и бактериофаги, вакцины и сыворотки, токсины и анатоксины, комплемент — весьма лабильное вещество и др. Опубликованные и неопубликованные исследования указывают на то, что на сегодняшний день этот метод перевода микробов или их продуктов метаболизма в анабиотическое состояние является непревзойденным.

В связи с вышеизложенным мы поставили перед собой задачу выяснить:

1. Как будет реагировать комплекс молочнокислых и ароматобразующих бактерий (закваска для масла) и отдельные его компоненты на высушивание в глубоком вакууме после предварительного замораживания в течение разных сроков хранения закваски при обычных температурных условиях хранения.

2. Может ли метод вакуумной сушки при замораживании быть использован для стабилизации типовых признаков производственно-ценных музейных культур в молочной промышленности.

Кроме того нас интересовал вопрос повышения выхода «микробного числа» молочнокислых бактерий в более короткие сроки их выращивания при добавлении различных «ростовых веществ» в обрат.

Методика

Культуры молочнокислых бактерий, дрожжей, плесеней и уксуснокислых бактерий, имеющих производственное значение, были получены из музея лаборатории сухих культур ВНИМИ[1], лаборатории Главмолоко, Научно-исследовательской лаборатории бродильной промышленности и выделены нами.

Чистота полученных культур проверялась проведением их через чашки. Биохимические свойства изучались в момент получения культур, а после вакуумной сушки — через различные сроки хранения. Жизнеспособность и динамика развития молочнокислых бактерий определялась как методом титрования в ° Тернера, так и путем посева на чашки с агаром из сухого обрата, изготовленного путем ферментативного переваривания по методу Богданова [1]: 100 г сухого обрата растворяется и кипятится с 1000 мл воды. После охлаждения до 45—40° добавляется 1 г панкреатина и 5 мл хлороформа. Колба закрывается корковой пробкой и ставится на 48—72 часа в термостат при 40°. Время от времени она встряхивается. Через 48—72 часа получается прозрачная жидкость зеленовато-желтого цвета и небольшой осадок, который отфильтровывается дважды через бумажный фильтр. Кипятится, устанавливается pH = 6,8—7,0. Стерилизация проводится при 120° 15 минут. Гидролизат заготавливается впрок. К готовому гидролизату прибавляется два объема 1,5% водного расплавленного агара. Смесь разливается во флаконы или пробирки. Стерилизация — при 120° 15 минут.

Увеличение «выхода микробной массы» изучалось на обрате из свежего молока и из сухого порошка с добавлением дрожжевого автолизата в разных концентрациях от 0,1% до 5% и с 5% настоем солодовых ростков и фильтратом из-под пленки Oidium lactis в возрасте 2—3 недель, культивируемом на обрате.

Дрожжевой автолизат готовился по следующей прописи: 1 кг пекарских прессованных дрожжей, нарезанных небольшими кусочками, автолизируется при температуре 55° на водяной бане или в термостате. Автолизат определяется по полному разжижению дрожжей. После отстаивания осадок сливается, фильтруется. Фильтрат разводится водопроводной водой из расчета 3 л на 1 кг дрожжей. Стерилизация — при 112° 20 минут. Для солодовых ростков и фильтрата Oidium lactis стерилизация дробная. Культивирование и выращивание плесеней, дрожжей и уксуснокислых бактерий производилось на сусле, сусловом агаре и сладкой сыворотке. Активность высушенных молочнокислых бактерий определялась по кислотности в ° Тернера; дрожжей — по энергии брожения и уксуснокислых бактерий — по скорости появления пленки и кислотонакоплению в колбах Виноградского на сусле, среде Геннеберга и сладкой сыворотке со спиртом. Сушка культур производилась в аппарате Флосдорфа и в камерном аппарате Титова — Земляникова в Институте контроля вакцин и сывороток им. Тарасевича при непосредственном участии Ярмольчука и Титова.

Качество высушенных заквасок проверялось в лабораторных и заводских условиях.

Экспериментальная часть

1. Влияние кратковременного замораживания и высушивания в глубоком вакууме на культуры микробов, имеющие практическое значение в молочной промышленности

Способ высушивания в вакууме после замораживания широко применяется в настоящее время при консервировании культур микроорганизмов. «Лиофилизация» устраняет путем быстрого замораживания объекта с последующей его дегидратацией в глубоком вакууме денатурирующее действие высушивания при высоких температурах. «Лиофильный» объект характеризуется неутраченной способностью к растворению, что свидетельствует о его ненарушенной коллоидно-химической структуре [9]. Культуры микробов и вирусов, подвергнутые обратимой дегидратации, сохраняют морфологические, культуральные, ферментативные, агглютинабильные и вирулентные свойства в течение многих месяцев и лет. На втором интернациональном конгрессе микробиологов

[1] Всесоюзный научно-исследовательский институт молочной промышленности.

этому вопросу были посвящены специальные доклады Elser и Thomas [12] и Swift [19]. В СССР метод лиофилизации проверялся на весьма разнообразных объектах (Речменский [9], Климентова, Крук и Ярмольчук [6]).

Нами изучался способ лиофилизации на культурах молочнокислых бактерий (Str. lactis 21 и 7, Вариететы Str. cremoris X и M и Str. paracitrovorus 182, 14, 95, Bact. casei, Bact. acidophilum и Bact. bulgaricum) и на комплексе культур (закваска для масла). Кроме того были подвергнуты действию высушивания дрожжи, сбраживающие лактозу 239 261 и Б, уксуснокислые бактерии, рекомендуемые нами для производства уксуса из сыворотки (Bact. orleanense 51 и Bact. Schüzenbachi 21 и Pen. Roqueforti).

Подготовительный этап к высушиванию состоял: 1) из размножения культур на соответствующих средах, 2) из разлива по ампулам или маленьким пробиркам, 3) из замораживания культур в ванне со смесью льда или снега с солью.

Длительность замораживания не превышала 1—2 минут. Высушивание производилось на коллекторном аппарате Флосдорфа или в камерном аппарате Титова — Землянникова. Сразу высушивалось по 100 или 50 ампул. На устройстве аппаратов не останавливаюсь: они достаточно полно описаны Флосдорфом [14] и Титовым [11].

Поддержание вымороженного объекта при температуре 15° в течение процесса высушивания осуществляется автоматически, вследствие сильной возгонки в вакууме водяных паров с поверхности высушиваемого материала. Образующиеся пары в аппарате Флосдорфа поглощаются сульфитом кальция, т. е. прокаленным гипсом, способным поглощать от 5,9 до 6,5% влаги по отношению к собственному весу. Гипс выдерживает 16—20 циклов генераций [6]. В камерном аппарате образующиеся пары отводятся и конденсируются при температуре —15°. Холод в конденсатор подводится от холодильной аммиачной машины. Проверка вакуума в запаянной ампулке производится катушкой Тесла в поле токов высокой частоты.

При испытании вышеуказанных культур с исходным количеством клеток микробов от 40 млн. до 300 млн. в образце после их высушивания и хранения в течение различных сроков была выявлена различная чувствительность бактерий к высушиванию в вакууме. Через 7 дней хранения ампулок при комнатной температуре количество жизнеспособных клеток снизилось до 83—40% в отдельных культурах. С течением времени происходило вымирание и через 6 месяцев количество жизнеспособных клеток колебалось от 40 до 0,002% для отдельных видов микробов. Более чувствительными оказались Pen. Roqueforti, дрожжи и уксуснокислые бактерии. Стрептококки даже через 6 месяцев сохранялись десятками миллионов в высушенных образцах. Инактивирующим моментом для жизнеспособности бактерий являлась потеря вакуума в ампулках или пробирках. В параллельно сохраняемых образцах культур в запаянных пробирках без замораживания и высушивания в вакууме процесс вымирания микробов шел значительно быстрее. Посевы часто оказывались стерильными уже спустя 30—60 дней. Некоторые же виды бактерий в этих условиях хранения были более устойчивыми (Str. paracitrovorus) и сохранялись в течение 6 месяцев в значительном количестве.

При подготовке к вакуум-сушке комплекс культур (закваска для масла) молочнокислых и ароматобразующих (5%) бактерий[2] смеши-

[2] В специально проведенных нами посевах из закваски на среды Богданова [1] для учета общего числа молочнокислых микробов и ароматобразующих эти соотношения до сушки и после сушки совпали.

вался в возрасте 16—18 часов; после смешивания добавлялась $^1/_3$ по объему стерилизованного обрата для понижения кислотности (15—50°). Опыты сушки показали, что количество жизнеспособных клеток сохранялось до 70—80% через 4 дня хранения, а через 3 месяца — до 50—10%. К 6 месяцам количество жизнеспособных клеток снизилось до 20—6%.[3] Кислотность в материнской закваске в возрасте 6 месяцев колебалась от 62 до 96° Т через 16—18 часов. При пассировании она возрастала. Аналогичные результаты были получены и при испытании закваски и расфасовке по 0,05 г в заводских условиях. Испытания были проведены на Вологодском молочном заводе под руководством Богданова. Закваска была активна: время свертывания «материнской» закваски — 14 часов при кислотности 72—80° Т. В дальнейших генерациях — от 8 до 10 часов. Кислотность достигала 90—110° Т. Вкусовые свойства были удовлетворительными даже у материнской закваски как при испытании в заводских, так и в лабораторных условиях, через различные сроки хранения.

Инактивация закваски наблюдалась и здесь при нарушении вакуума. В ампулах с нарушенным вакуумом через 6 месяцев количество микробов достигало только 200—700 колоний вместо десятков миллионов в ампулках с вакуумом. Подтверждение быстрого отмирания микробов в условиях сухого воздуха находим в специально поставленных опытах Долинова и Балаян [4]. В то время как пневмококки в вакууме сохраняли свою жизнеспособность в течение 38 месяцев, посевы из ампулок, хранившихся в условиях сухого воздуха, оставались стерильными. Rahn и Bigwood [17] сообщают об инактивации Str. lactis в условиях хранения при доступе воздуха и жизнеспособности в атмосфере азота.

Обычно сушка образцов закваски лиофильным способом приурочивалась к выпуску партий заквасок лаборатории сухих культур ВНИМИ. Комплексы культур составлялись из той же смеси культур, которая шла в производство. Образцы сухих заквасок ВНИМИ хранились параллельно с лиофильными образцами. Закваска ВНИМИ в расфасовке около 1 г состояла из плохо растворимого «микробного» порошка с крахмалом и содержала от 20 до 10 млн. бактерий в 1 г. Кислотность материнской закваски колебалась от 64 до 90° Т. Количество бактерий резко падало к трем месяцам хранения при комнатной температуре, достигая 0,5—2%. При изучении динамики развития в посевах 15-дневной закваски ВНИМИ и лиофильной в материнской закваске ВНИМИ также наблюдалось отставание в развитии микробов в течение первых четырех часов после инокуляции.

При расфасовке 0,05 г количество микробов в 1 мл достигало 8 млн.; при расфасовке 0,025 г — 4 млн., в то время как в сухой закваске ВНИМИ в расфасовке около 1 г количество микробов не превышало 30 тыс.

Кислотность через 18 часов в сухой закваске ВНИМИ была 44° Т, в то время как в лиофильной закваске кислотность за это время поднялась до 88° Т.

Для изучения влияния лиофильного процесса высушивания на биологические свойства молочнокислых микробов были проведены наблюдения над формой колоний, активностью кислотообразования в обрате, отношением к углеводам и образованием летучих кислот. Результаты этих наблюдений показали, что как в контрольных культурах из музея, так и в лиофильных культурах Bact. casei, Bact. acidophilum и Bact. bulgaricum преобладали шероховатые варианты. Явление диссоциации и в других изучаемых культурах носило ограниченный характер. Кислотообразовательная функция и биохимическая активность к различным

[3] Через $1^1/_2$ года хранения лиофильных образцов закваски для масла была получена активная материнская закваска.

углеводам резко не менялись. Колебания в наличии летучих кислот лежали в пределах, скорее обусловленных техническими случайностями, чем изменчивостью, что и подтверждалось определением летучих кислот из другой ампулки или из выделенных культур с агара из разных колоний.

Уксуснокислые бактерии так же быстро образовывали пленку, как и контрольные музейные культуры на среде Геннеберга, сусле и молочной сыворотке со спиртом. Энергично шло накопление уксусной кислоты, достигая 9—8%.

Ниже приводим данные по кислотообразованию у лиофильных культур молочнокислых бактерий после 6 месяцев хранения (таблицы 1 и 2).

Таблица 1

Кислотность в лиофильных культурах

Виды	Кислотность в °Тернера			
	после сушки через		до сушки через	
	18 час.	96 час.	8 час.	96 час
Bact. casei	150	320	145	310
» bulgaricum . .	100	200	100	230
» acidophilum . .	145	220	110	210

Исходные культуры характеризовались теми же показателями по кислотности и наличию летучих кислот.

Подводя итоги, считаем, что на основании литературных данных и наших наблюдений способ лиофилизации музейных культур перспективен.

Таблица 2

Кислотность и наличие летучих кислот в лиофильных культурах

Виды	Кислотность в °Тернера	Летучие кислоты в 100 мм дестиллята
Str. lactis	90—80	1,0—0,7
» cremoris . . .	86—74	0,9—0,7
» paracitrovorus .	52—44	2,2—1,8
	90—80	2,3—2,1

Производственно-ценные культуры месяцами и годами могут сохраняться, оставаясь стабильными. Очевидно, путем повышения урожаев «микробного числа» в исходном материале и снятия его во-время можно будет устранить большую потерю клеток как в процессе замораживания и высушивания, так и в процессе продолжительного хранения их. Перспективен этот способ сохранения культур микробов и в научно-исследовательской работе, давая возможность сохранять культуры микробов в стабильном состоянии и возвращаться к ним без страха потери их. Рентабелен он также и в производстве разнообразных заквасок

и в производстве чистых культур как способ, который гарантирует большую чистоту, повышает количество жизнеспособных клеток, активность и удлиняет сроки хранения.

2. Влияние «ростовых» веществ на интенсивность размножения бактерий в закваскаx

Из вышеизложенного ясно, что метод лиофилизации оказывает большую услугу в деле сохранения большого числа живых микробов и продления сроков хранения различных биопрепаратов.

Необходимо было также повысить выход микробной массы до высушивании и снять «урожай» в наиболее активном состоянии культуры.

Королев (7) увеличивал количество микробов до высушивания уплотнением посредством сычуга и хлористого кальция, но у этого способа имеется ряд существенных недостатков (нестерильность операции, высокая кислотность сгустка). Роджерс [16] указывает, что «культивирование микробов в предварительно конденсированном молоке увеличивает число сохранившихся в сухой культуре живых клеток, не понижая их активности». В работе Канунниковой [4] выявлено, что если отсевы производить из основной культуры в фазе гибели клеток, то отсеянные бактерии в свежей питательной среде уже не могут восстановить своей способности к нормальному росту и бродильной активности.

Специальные исследования показали, что поведение бактерий в отсевах объясняется возрастным состоянием самих клеток, а не продуктами метаболизма.

Стремясь найти оптимальные условия для повышения выхода «микробного числа» в закваскаx, мы исходили из положения о значении «ростовых веществ» для микроорганизмов и, в частности, для молочнокислых микробов, так как различные молочнокислые микробы к наличию ростовых веществ очень требовательны (Orla-Jensen [18], Палладина [8]).

Известно также, что различные партии молока отличаются по росту в них бактерий (Knudsen и Sörensen [15]), и «что это явление дает особенно себя неприятно знать при испытании сухих заквасок. Исправление этого может быть достигнуто прибавлением дрожжевого автолизата; однако техника прибавления дрожжевого автолизата до сих пор остается совсем неразработанной» (Королев [7]). Это побудило нас поставить опыты с добавлением в обрат из свежего молока и в обрат из порошка различных ростовых веществ, содержащихся в натуральных экстрактах, а также с K_2HPO_4. Rogers [16] указывает, что от прибавления K_2HPO_4 увеличивается число клеток в жидкой культуре. Были испытаны следующие факторы роста: экстракт из солодовых ростков, фильтрат из-под пленки Oidium lactis, культивируемого на обрате в течение 3 недель, дрожжевой автолизат.

Интенсивность размножения бактерий и комплекса культур молочнокислых и ароматобразующих бактерий мы учитывали как методом титрования, так и, в отдельных случаях, высевом на чашки с агаром из обрата, переваренного панкреатином. Приведенные цифры показывают, как упомянутые выше вещества повышают кислотообразование испытуемых культур, что в данном случае стоит в прямой связи с ростом бактерии. Данные по кислотности в табл. 3 показывают, что дрожжевой автолизат в концентрации 0,15% стимулирует рост различных молочнокислых бактерий как в чистой культуре, так и в комплексе культур. Стимули-

[4] «Зависимость активности молочнокислых бактерий от возраста культуры». Микробиология т. XIV, вып. 5, 1945.

рующее влияние дрожжевого автолизата особенно сильно заметно в течение 6—9 часов после инокуляции. Некоторое увеличение стимулирующего действия дрожжевого автолизата заметно было при увеличении концентрации до 3%. При дальнейшем увеличении до 5% значительного эффекта от добавления отмечено не было.

Таблица 3

Добавления в обрат дрожжевого автолизата

Наименование культур	Обрат (Контроль)			Обрат+дрожжевой автолизат 0,15 %			3 %		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Комплекс культур (закваска для масла)	32	58	67	32	64	82	30	74	88
Str. paracitrovorus	21	29	34	30	42	46			
» cremoris	34	46	56	32	60	—			
« lactis	38	50	96	40	60	82			

Вторая серия опытов была проведена на обрате из сухого порошка. Обрат из порошка представляет настолько удобное сырье как питательная среда, что вопрос о замене обрата из свежего молока обратом из порошка заслуживает всестороннего изучения. Однако практика работы с обратом из порошка показывала, что не всегда молочнокислое брожение протекает нормально. Часто отмечались случаи отставания от нормального брожения. Необходимо было выяснить, не лежит ли причина отставания в отсутствии необходимых для бактерий ростовых веществ, которые могли быть утеряны при технологической обработке обрата в сухом виде, тем более, что, как видно из табл. 4, даже нормальный обрат не является оптимальной средой для развития молочнокислых бактерий. Для проверки были поставлены опыты с добавлением дрожжевого автолизата вытяжки из солодовых ростков, фильтрата Oidium lactis и 1% K_2HPO_4. Контролем служил обрат из свежего молока. Проведенные опыты на 4 культурах и комплекс культур показали, что нормальный ход молочнокислого брожения в обрате из порошка может быть достигнут путем добавления различных ростовых ве-

Добавления в обрат из по

Вид	Str. paracitrovorus				Str. cremoris			
Среды	Ч			а				
	4	6	9	24	4	6	9	24
	Кислотность в							
Обрат (контроль)	24	30	50	52	40	44	56	86
«Сухой» обрат	18	20	24	46	22	36	46	76
Сухой обрат + дрожжевой автолизат	28	34	58	76	40	47	56	86
Сухой обрат + солодовые ростки	26	32	56	84	38	40	56	90
Сухой обрат + фильтрат Oidium lactis	30	34	55	80	34	50	70	78
Сухой обрат + 1% K_2HPO_4	20	22	36	66	20	32	46	100

ществ из натуральных экстрактов. Добавление K_2HPO_4 хотя и повышает кислотность обрата через 24 часа, но стимуляции развития бактерий в течение более коротких промежутков времени отмечено не было. Итак, добавлением вышеуказанных факторов роста найдены были оптимальные условия для сбраживания молочнокислыми бактериями обрата из порошка.

Из табл. 4 видно, что во многих случаях при добавлении ростовых веществ кислотность в обрате из порошка была даже выше, чем в обрате из свежего молока (контроль). Следовательно, вполне возможно рекомендовать обрат из порошка с добавлением того или иного фактора роста для повседневного культивирования бактерий. В целях еще большего повышения выхода микробной массы в течение более короткого промежутка времени, чем это применяется при обычном технологическом процессе производства заквасок, были поставлены опыты с добавлением различных количеств культур и дрожжевого автолизата как на обрате из свежего молока, так и на обрате из порошка. Ранее нам удалось добиться нормального молочнокислого брожения на обрате из порошка с добавлением от 0,15 до 3% дрожжевого автолизата. При повышении посевного материала до 2% накопление микробной массы идет интенсивнее и сокращаются сроки максимального выхода клеток бактерий. Особенный эффект был получен при добавлении 3% дрожжевого автолизата. Увеличением концентрации дрожжевого автолизата и количества посевного материала удается повысить выход бактерий в течение 6—9 часов, достигая возможного максимума развития в жидкой среде. Считаем, что выход микробов в закваске можно еще повысить путем выращивания их на матрацах и дальнейшего смешивания в определенных соотношениях, но это вопрос специальных исследований.

На основании полученных экспериментальных данных по высушиванию культур молочнокислых бактерий и закваске для масла методом лиофилизации и опытов по повышению выхода микробного числа за более короткие сроки на обрате и обрате из порошка с дрожжевым автолизатом, мной предложена технологическая схема производства заквасок для масла лиофильным методом, более рациональная как по выходу микробных клеток, так и обеспечивающая большую микробиальную чистоту в закваске (вследствие введения стерильного розлива).

Таблица 4

рошка ростовых веществ

Str. lactis				«U»				Смесь культур (закваска)			
с ы											
4	6	9	24	4	6	9	24	4	6	9	24
° Тернера											
40	—	60	84	24	36	—	82	34	40	—	115
26	30	46	96	22	24	—	74	20	28	—	96
—	34	65	96	34	50	—	98	32	54	—	98
—	28	62	96	34	50	—	98	34	50	—	92
42	—	72	74	34	44	—	78	34	60	—	85
28	50	62	96	20	26	—	102	30	56	—	114

Выводы

1. Способ кратковременного замораживания и высушивания в глубоком вакууме широко применяется в настоящее время для консервирования производственно-ценных микроорганизмов без потери их культуральных, биохимических, агглютинабильных и вирулентных свойств. Культуры сохраняются месяцами и годами.

2. Способ кратковременного замораживания и высушивания в глубоком вакууме («лиофилизация») применим также и для перевода в состояние анабиоза ценных музейных культур в молочной промышленности.

3. Культуры Str. lactis, Str. cremoris, Str. paracitrovorus, Bact. casei, Bact. acidophilum и Bact. bulgaricum при хранении их в течение 6 месяцев после кратковременного замораживания в глубоком вакууме оставались стабильными, проявляя индивидуальную чувствительность к высушиванию.

4. В культурах молочнокислых бактерий (закваска для масла) жизнеспособные клетки сохраняются в значительном количестве (десятки миллионов в 0,05—0,025 г закваски) после 6 месяцев хранения при комнатной температуре. Закваска остается стабильной как в отношении кислотообразования, так и биохимических и органолептических свойств. Метод лиофилизации повышает качество заквасок.

5. Уксуснокислые бактерии (Bact. orleanense, Bact. Schüzenbachi), дрожжи и Pen. Roqueforti после кратковременного замораживания и высушивания в глубоком вакууме сохраняют свою жизнеспособность в течение 6 месяцев хранения без потери активности и биохимических свойств.

6. Введение в обрат, полученный из порошка, ростовых веществ в виде дрожжевого автолизата в количестве от 0,15 до 3%, солодовых ростков и фильтрата Oidium lactis стимулирует развитие различных молочнокислых бактерий Str. lactis, Str. cremoris и Str. paracitrovorus и комплекса культур (закваска для масла). Молочнокислое брожение протекает нормально.

7. Комбинацией добавления в обрат дрожжевого автолизата от 0,15 до 3% и увеличением посевного материала до 2% комплекса культур (закваска для масла) возможно увеличить выход микробных клеток за более короткий промежуток времени, сокращая сроки выращивания в подготовительном этапе в призводстве культур до 6—9 часов.

8. Метод лиофилизации молочнокислых и других культур следует внедрить в практику работы лабораторий.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт молочной промышленности
Москва

Получено 14. IV. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов В. М. Изучение состава молочнокислой микрофлоры молочных продуктов различных климатических зон. Рукопись. Тр. ВНИМИ, 1946.
2. Гибшман М. Р., Банникова Л. А. и Дерябина М. А. Влияние различных методов сушки и хранения культур на свойство молочнокислых стрептококков. Молочная промышленность, № 8, стр. 5, 1940.
3. Гибшман М. Р., Банникова Л. А. и Дерябина М. А. Улучшение методов приготовления и производственного использования заквасок. Рукопись. Тр. ВНИМИ, 1940.
4. Долинов К. Е. и Балаян Л. Б. Об условиях высушивания пневмококковых культур. Журн. микроб., эпид. и иммунолог., № 7, стр. 30, 1946.
5. Иерусалимский Н. Д. Ростовые вещества в микробиологии, их природа и значение в жизни микроорганизмов. Микробиология, т. IX, вып. 7—8, 1940.

6. Климентова А., Крук Р. и Ярмольчук Г. Консервирование бактериологических и биологических препаратов при высоком вакууме. Журн. микроб., эпид. и иммунолог., т. 7, стр. 14, 1942.
7. Королев С. А. Основы технической микробиологии молочного дела. Сельхозгиз, Москва, 1932.
8. Палладина О. К. Биология возбудителей молочнокислого брожения. Ленинград, 1940.
9. Речменский С. С. Лиофилизация как метод консервирования биопрепаратов. Журн. микроб., эпид. и иммунолог., № 7, стр. 30, 1940.
10. Скородумова А. М. Практическое руководство по технической микробиологии молочного дела. Сельхозгиз, Москва, 1933.
11. Титов Н. Н. Технология биопрепаратов. Сельхозгиз, Москва, 1945.
12. Elser W. J., Ruth A. and Thomas R. The preservation of Bacteria in an unaltered state for an indefinite period. Report of Proc. II Intern. Congress of Microbiology, London, p. 41, 1937.
13. Grakes R. I. N. and Adair M. E. High-vacuum condensation drying of proteins from the frozen state. J. Hyg., v. 39, No. 4, p. 413, 1939.
14. Flosdorf E. W. and Mudd S. An improved procedure and apparatus for preservation of sera, microorganisms and other substances — the cryochemical process. J. Immunol., v. 34, p. 469, 1938.
15. Knudsen S. U. u. Sörensen S. Über die Milch des Nährboden für gewisse Milchsäurebakterien. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 71, 1927.
16. Rogers L. A. The preparation of dried cultures. J. Inf. Dis., v. 4, p. 100, 1914.
17. Rahn O. and Begwood F. W. The effect of low t° on Strept. lactis. Archiv. Microbiol. Bd. 10, Heft 1, S. 1, 1939.
18. Orla-Jensen S. Otte N. u. Snog Kjaer A. Die Stickstoffnährung der Milchsäurebakterien. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 94, Nr. 11, S. 460, 1936.
19. Swift F. The preservation of bacterial cultures by freezing and drying. Rep. Proc. II Intern., Congress of Microbiology, p. 40, London, 1937.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ УГЛЕВОДОРОДЫ

Г. П. Славнина

Метод микробиологической разведки нефтяных и газовых месторождений был предложен Могилевским [2].

Лабораторная методика заключается в том, что испытуемый грунт заливается минеральной средой и помещается в атмосферу смеси воздуха с углеводородным газом. В случае нахождения в исследуемом грунте бактерий, окисляющих углеводороды, на поверхности питательной среды развивается бактериальная пленка.

Основными индикаторными организмами являются бактерии, окисляющие жидкие и газообразные углеводороды.

Существующие методы диагностики организмов нуждаются в усовершенствовании.

Необходимо быстро и точно на ранних стадиях развития распознавать бактерий, окисляющих углеводороды. Это особенно важно в случае развития смешанных культур. Ввиду этого автором проводились исследования по применению флуоресцентного метода к диагностике отдельных видов углеводородоокисляющих бактерий.

Arloing, Policard и Langeron [3] были первыми исследователями, установившими факт свечения бактерий в ультрафиолетовых лучах. Несколько позднее Gassul и Zolkovic [7], исследуя бактериальные культуры, помещенные в ультрафиолетовые лучи с длиной волн от 300—400 mμ, пришли к выводу, что виды бактерий можно различать по характерным флуоресцентным свойствам. Danielson [4], подтверждая специфическое свечение бактерий в лучах Вуда, считает, что это свойство недостаточно определенно и им не всегда можно пользоваться для диагностики бактерий. Lasseur, Dupaix и Lecaille [10] провели более обширные исследования; они проанализировали в лучах Вуда 33 вида бактерий и дрожжи и пришли к выводу, что почти все исследованные бактерии при 3 650 Å обнаруживают флуоресценцию. Кроме того Lasseur исследовал влияние реакции среды, Labrousse [9] — влияние различных солей на флуоресценцию бактерий.

В сводке Radley и Grant [11] в отделе «Bacteriology» приведены исследования по флуоресценции бактерий. Изучались наиболее распространенные патогенные бактерии: возбудитель тифа, паратифа, дезинтерии, туберкулеза и др. Оказалось, что все эти виды бактерий характеризуются определенным специфическим цветом флуоресценции. Однако в ряде случаев интенсивность свечения весьма незначительна и цвет флуоресценции не всегда удается точно определить.

Имеются также сведения по флуоресценции бактерий в работах Danwort [5], Dhéré [6], Лескова [1]. Haitinger [8] описал исследования по флуоресцентной микроскопии.

Исследуемые нами бактерии, окисляющие углеводороды, культивировались в присутствии соответствующих жидких и газообразных углеводородов. Поэтому при изучении свечения бактерий, естественно, возникал вопрос, не зависит ли эффект флуоресценции бактерий от находящихся в питательной среде соответствующих углеводородов. Известно, что очень сильная флуоресценция обнаруживается парафиновыми углеводородами и минеральными маслами (нефть, керосин, битумы и машинные масла).

Однако чистые углеводороды, как гексан, пентан, гептан и бензол, не флуоресцируют. Правда, некоторые авторы (Haberl [11]) отмечали свечение циклогексана, но это возможно лишь в том случае, если уг-

леводород был нечистый или подвергается фотохимическому разложению (Padmanabhana [11]). [1]

Методика

Исследование по флуоресценции проводилось с бактериями, выделенными из грунтов различных районов (нефтеносных и нефтеносных), а для сравнения также с некоторыми культурами, изолированными в лаборатории или полученными из музея живых культур Московского государственного университета.

Бактерии, окисляющие углеводороды, были выделены на минеральной среде следующего состава: вода водопроводная, KNO_3 — 0,1%, $MgSO_4$ — 0,02%, K_2HPO_4 — 0,1%, NaCl — 0,1% в атмосфере соответствующего газа (метан, этан, пропан) или жидкого углеводорода (пентан, гексан, гептан) при pH среды = 7,0—7,2 и температуре 28—32°. Аммонификаторы выделялись на МПБ или агаре (среда Казакова); целлюлозоразрушающие бактерии (анаэробные) — на среде Омелянского с источником клетчатки в виде фильтровальной бумаги; нитрификаторы (нитритные и нитратные) — на среде Виноградского. Опыты проводились как с чистыми, так и с накопительными культурами.

Бактериальные культуры просматривались в лучах Вуда под аналитической кварцевой лампой, снабженной фиолетовым фильтром, пропускающим ультрафиолетовые лучи определенного диапазона (300—400 мμ).

Предварительно свечение культуры проверялось в жидкой питательной среде или на агаре. Затем в лучах Вуда анализировались бактериальные мазки, нанесенные на предметные стекла или на фильтровальную бумагу и на гигроскопическую вату.

Цвет флуоресценции и ее интенсивность определялись визуально. Контролем служила стерильная питательная среда и соответствующий адсорбент.

Необходимо отметить, что стеклянная посуда (пробирки, колбочки и др.), в которой просматриваются бактерии, должна быть предварительно проверена в ультрафиолетовых лучах под кварцевой лампой.

Предметные стекла при малом количестве материала могут маскировать бактериальную флуоресценцию цветом стекла. Очень неудобны агаровые среды, так как они обладают собственной флуоресценцией. Вата является подходящим адсорбентом для бактерий: ее флуоресценция так слаба и специфична, что не мешает исследованию свечения бактерий.

Экспериментальные данные

В природных условиях, а иногда и в накопительных культурах бактерии, окисляющие углеводороды, окружены различными почвенными бактериями. Совершенно очевидно, что, разрабатывая флуоресцентный метод диагностики углеводородоокисляющих бактерий, необходимо учитывать наличие других микроорганизмов.

Нами проводилась серия опытов с целью проверки данных других авторов и выяснения наличия свечения в условиях наших опытов у ряда видов обычных почвенных бактерий, которые в естественных условиях часто сопутствуют бактериям, окисляющим углеводороды. Данные анализов сведены в табл. 1.

Рассматривая результаты исследования различных бактерий в лучах Вуда, видим, что нитрификаторы и целлюлозоразрушающие свечения не показывают. Аммонификаторы характеризуются голубой флуоресценцией. Этот цвет флуоресценции является вообще характерным для большинства непигментированных бактерий (Лесков [1]). С другой стороны, эта голубоватая флуоресценция не является показательной, поскольку она присуща многим белковым веществам, в частности альбумину.

Пигментные бактерии обладают флуоресценцией в пучке ультрафиолетовых лучей, сохраняя при этом цвет природного пигмента колоний. Однако флуоресценция их очень слабая, и в тонком слое при исследовании в флуоресцентном микроскопе почти незаметна.

[1] Цит. по Radley.

Таблица 1

Исследование некоторых бактерий в лучах Вуда

Микроорганизмы	Цвет бактериальной культуры	Флуоресценция
Аммонификаторы		
Bac. subtilis	Не пигментирована	Бело-голубая
» mesenthericus	»	Интенсивно-голубая
» mycoides	»	Голубая
Proteus vulgaris	»	Светлоголубая
Нитрификаторы		
Нитритные	»	Не флуоресцируют
Нитратные	»	»
Целлюлозоразрушающие	»	»
Пигментные		
Bact. prodigiosum	Красная	Красная
» pyocyaneum	Синяя	Синеватая
Sarcina flava	Желтая	Желтая

Следующая серия опытов была поставлена с целью выяснить наличие флуоресценции у бактерий, окисляющих углеводороды. Были исследованы бактерии, окисляющие жидкие (пентан, гексан и гептан) и газообразные (метан, этан, пропан) углеводороды на различных стадиях развития и при различных условиях культивирования.

Таблица 2

Флуоресценция бактерий, окисляющих углеводороды

Бактерии	Цвет бактериальной пленки	Флуоресценция
Бактерии, окисляющие газообразные углеводороды:		
а) метаноокисляющие (Methanomonas methanica)	Коричневая или светло-серая	—
б) этаноокисляющие	Желтоватая или розовато-палевая	—
в) пропаноокисляющие	Желтая или кораллово-красная	—
Бактерии, окисляющие жидкие углеводороды (пентан, гексан, гептан)		
а) Bacterium aliphaticum liquefaciens	Бело-серая, при культивировании выделяется растворимый зеленый пигмент	Зеленая (яркое свечение)

Основные индикаторы на нефть и горючие газы — бактерии, окисляющие метан и пропан, а также этаноокисляющие бактерии свечения в лучах Вуда не показали (табл. 2). В противоположность этому, есте-

ственной флуоресценцией обладает Bact. aliphaticum liquefaciens, окисляющая пентан и высшие углеводороды. Bact. aliphaticum liquefaciens характеризуется интенсивнозеленой флуоресценцией, резко выделяясь среди всех исследованных бактерий очень ярким свечением.

При любезном содействии М. Н. Мейселя (Институт микробиологии АН СССР) были просмотрены культуры Bact. aliphaticum liquefaciens в флуоресцентном микроскопе. Наблюдения показали, что очень интенсивной естественной флуоресценцией обладают бактериальные тела, хотя и продукты их жизнедеятельности не лишены некоторого свечения.

Как показали дальнейшие опыты, макроскопическое выявление флуоресценции у Bacterium aliphaticum liquefaciens связано с пигментацией культуры. По мере роста бактерий усиливается окрашивание культуры и параллельно нарастает интенсивность свечения (табл. 3).

Таблица 3

Изменение интенсивности флуоресценции и пигментации при развитии Bact. aliphaticum liquefaciens

Дата	Развитие бактериальной культуры	Пигментация культуры	Флуоресценция
24/IV	Посеяна	—	—
26/IV	Слабая муть	—	—
27/IV	Явная муть	Очень слабая	Слабая
28/IV	Тонкая пленка	Явное окрашивание	Полная
29—30/IV	Плотная пленка	Интенсивное окрашивание	Очень яркая

Далее выяснилась зависимость между флуоресценцией Bact. aliphaticum liquefaciens и реакцией среды.

Для опыта были взяты питательные среды с различными значениями pH: от 5 до 7,8. В питательные среды вносилась чистая культура Bact. aliphaticum liquefaciens. В присутствии жидкого углеводорода рост бактерий протекал при температуре 28—30° в течение 7 дней. Затем проводился подсчет количества бактерий прямым методом под микроскопом и определялась их флуоресценция.

Таблица 4

Влияние pH среды и количества бактерий на флуоресценцию Bact. aliphaticum liquefaciens

pH среды	Количество бактерий в 1 см³ в млн.	Флуоресценция
5,0	4,6	Очень слабозеленая
5,6	47,8	Слабозеленая
6,0	80,5	Яркозеленая
6,6	101,2	Очень яркозеленая
7,0	72,3	Интенсивно зеленая
7,4	30,1	Слабозеленая
7,8	18,2	»

Из таблицы видно, что наилучшее развитие бактерий наблюдается при pH = 6,0—7,0, с оптимумом pH = 6,6, и флуоресценция, безусловно связанная с количеством бактерий, наибольшей интенсивностью характеризуется при тех же показателях pH. Флуоресценция в данном опы-

те также связана с пигментацией бактерий. В случае очень слабого развития бактерий и бледной пигментации флуоресценция едва заметна. В более старых культурах пигмент со временем буреет. Однако если пигмент образовался, то и после его изменения сохраняется окраска первоначальной флуоресценции. Совсем старые, 8—10-месячные культуры сохраняют свечение.

Опыты по совместному выращиванию бактерий, окисляющих жидкие и газообразные углеводороды, показали, что если доминируют Bact. aliphaticum liquefaciens, культура обладает явной зеленой флуоресценцией.

Примесь Bact. aliphaticum liquefaciens в самых минимальных количествах может быть обнаружена благодаря характерному свечению. Эти результаты дают возможность использовать флуоресцентный метод для анализа бактериальной пленки на присутствие бактерий, окисляющих жидкие углеводороды, если культура получена в смеси парообразных и газообразных углеводородов.

Выводы

1. Исследование ряда видов почвенных бактерий, в частности нитрификаторов, некоторых аммонифицирующих бактерий и культур накопления анаэробных целлюлозоразрушающих, показало, что первичной флуоресценцией обладают лишь аммонификаторы.

Как смешанные культуры, так и отдельные виды (Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bac. mesenthericus и др.) в ультрафиолетовых лучах (с длиной волн от 300—400 mμ) дают голубое свечение.

2. Изученные пигментные бактерии Bact. prodigiosum, Bact. pyocyaneum и Sarcina flava обладают флуоресценцией в пучке ультрафиолетовых лучей, сохраняя при этом основной цвет природного пигмента.

3. Исследование углеводородной микрофлоры под кварцевой лампой привело автора к заключению, что бактерии, окисляющие газообразные углеводороды (метан, этан и пропан), свечения не показывают.

4. Естественной яркозеленой флуоресценцией обладает Bact. aliphaticum liquefaciens, окисляющая пентан и высшие углеводороды.

5. Наилучшее развитие Bact. aliphaticum liquefaciens протекает при pH = 6,0—7,0, и флуоресценция, безусловно связанная с количеством бактерий, наибольшей интенсивностью характеризуется при той же реакции среды.

6. Появление флуоресценции у Bact. aliphaticum liquefaciens связано с пигментацией культуры. По мере роста бактерий усиливается окрашивание культуры и параллельно нарастает интенсивность свечения.

7. Исследования Bact. aliphaticum liquefaciens в флуоресцентном микроскопе показали, что очень интенсивной естественной флуоресценцией обладают сами бактериальные тела, хотя и продукты их жизнедеятельности не лишены некоторого свечения.

8. При культивировании бактерий в смеси парообразных и газообразных углеводородов присутствие Bact. aliphaticum liquefaciens легко может быть обнаружено благодаря характерной естественной флуоресценции.

9. Флуоресцентный метод может быть использован для распознавания Bact. aliphaticum liquefaciens в смешанных культурах.

Сектор Бактериальной разведки
нефтегазосъемки
Москва

Получено 14. IX. 1946

ЛИТЕРАТУРА

1. Лесков Г. Д. Люминесценция бактерий и грибков. Вопросы питания, М., 1940.
2. Могилевский Г. А. Бактериальный метод разведки на нефть и природные газы. Разведка недр, № 12, стр. 32, 1940.
3. Arloing F., Policard A. et Langeron L. Aspects offerts par diverses cultures microbiennes sous l'action des radiations émises par la lampe à arc au mercure après filtration par des écrans de Wood (lumière de Wood). C. R., v. 1, p. 261, 1925.
4. Danielson E. Zur Unterscheidung von Bakterien-Kulturen mit Hilfe der Quarzlampe. Ctbl. Bakt., I Abt., Bd. 115, S. 225, 1930.
5. Dankwort P. W. Lumineszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht. 3. erweiterte Aufl., Leipzig, 1934.
6. Dhéré C., Glucksmann S. et Rapetti L. Sur les applications de la spectroscopie et de la spectrographie de fluorescence en microbiologie, C. R. Soc. Biol., v. 114, p. 1250, 1933.
7. Gassul R. u. Zolkovic A. Ueber Differenzierungsversuche an Bakterienkulturen mit Hilfe der sogenannten Woodschenstrahlen. Ctbl. Bakt., I Abt., Bd. 104, S. 503, 1927.
8. Haitinger M. Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig, 1938.
9. Labrousse F. La fonction fluorescigène chez les bactéries phytopathogènes. C. R., v. 194, p. 2173, 1932.
10. Lasseur T., Dupaix A., and Lecaille L. Fluorescence des corps microbiens. Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm., Nancy, v. 4, p. 85, 1931.
11. Radley J. and Grant J. Fluorescent analysis in ultraviolet light. London, 1939.

О ТОКСИЧНОСТИ СРЕДЫ ВИЛЬСОН — БЛЕРА ДЛЯ АНАЭРОБОВ

Н. Н. Крицкая

Для выделения анаэробов пользуются средой Вильсон — Блера с железом и сернистокислым натрием. На среде Вильсон — Блера анаэробы дают отчетливые колонии, окруженные черным осадком сернистого железа, и это позволяет сравнительно легко выделять культуры анаэробных бактерий. Считается, что среда Вильсон — Блера хороша для быстрой диагностики Bac. perfringens. При значительном количестве Bac. perfringens в анализируемом материале почернение среды наступает уже через 2—4 часа. Являясь обычно хорошей дифференциальной средой, среда Вильсон — Блера часто тормозит рост анаэробов, а иногда и совсем парализует, оставаясь стерильной.

В нашей практической работе по выделению анаэробов из пищевых продуктов, при параллельных посевах исходного материала на среду Вильсон — Блера и на сахарный агар часто приходилось сталкиваться с задержкой роста анаэробов на среде Вильсон — Блера, а иногда и с полным его отсутствием, в то время, как высевы на сахарный агар давали рост обычно уже на вторые сутки.

Наши наблюдения над депримирующим действием среды Вильсон — Блера согласуются с данными, приводимыми в работе Черниковой [4]. При незначительном содержании Bac. perfringens в исследуемом материале (меньше 30 000 микробных тел) или при большом количестве стрептококков, угнетающих рост анаэробов, среда Вильсон — Блера не дает почернения даже через несколько суток. В таких случаях Черникова рекомендует применять среду Робинзон — Стоваля (модификация среды Вильсон — Блера, агар заменен молоком).

Однако для выделения чистой культуры анаэробов среда Робинзон — Стоваля мало пригодна, так как она является средой накопления и не дает возможности дифференцировать различные виды микробов.

Среда Вильсон — Блера является наиболее подходящей для этих целей. Задержка роста анаэробов на этой среде объясняется, как мы полагали, не только невысоким содержанием микробов в исследуемом материале, но также и составом самой среды.

В литературе имеются указания на то, что концентрация солевых ингредиентов среды Вильсон — Блера может быть понижена в 2—3 раза, причем чувствительность среды от этого даже улучшается (Миллер [1], Цып [1]).

Задачей нашей работы было выяснить, что́ именно в среде Вильсон — Блера угнетает жизнедеятельность бактерий и, в зависимости от полученных результатов, попытаться исправить недостатки среды.

Экспериментальная часть

Мы употребляли среду Вильсон — Блера, приготовленную на бульоне Хоттингера из плаценты с 0,75% агара и 1% глюкозы, ex tempore прибавлялись 10 см³ 20% свежеприготовленного раствора сернистокислого натрия и 1 см³ 8% раствора хлорного железа.

[1] Цитируется по Минкевичу [2].

Опыты проводились с анаэробными культурами, полученными из Института им. Мечникова. Культура Bac. sporogenes выделена нами из почвы.

Культуры аэробных бактерий частично получены из музея Московского государственного университета, частично взяты из коллекции Центральной санитарно-гигиенической лаборатории. Чистота культуры проверялась перед каждым опытом.

Развитие бактерий на среде Вильсон — Блера

Эта серия опытов была поставлена с целью выяснить степень токсичности среды Вильсон — Блера для анаэробных и аэробных бактерий, а также выявить компоненты, действующие тормозящим образом на рост бактерий.

Приготовлялись среды Вильсон — Блера, Вильсон — Блера без железа, Вильсон — Блера без сульфита, Вильсон — Блера без сульфита и железа. Контролем служил агар, приготовленный из плаценты методом Хоттингера.

Опыты проводились с тремя анаэробными и семью аэробными культурами. Посевным материалом служила эмульсия, приготовленная путем смыва 2 $см^3$ стерильной воды с суточной агаровой культуры. Анаэробные бактерии засевались в количестве 0,1 $см^3$ на 6 $см^3$ среды, разлитой столбиком в узкие пробирки.

Аэробные бактерии засевались штрихом на среды, скошенные в обычных пробирках. Посевы ставились в термостат при 37°. Результаты опытов учитывались ежедневно. Из табл. 1 видно, что из семи аэробных культур пять культур не дали роста на среде Вильсон — Блера в течение 15 дней. B. coli и B. proteus дали рост только на 3—4-е сутки.

На среде Вильсон — Блера без железа или сульфита все 7 культур росли, но слабее, чем на контрольной среде МПА. Анаэробные бактерии, как видно из таблицы, росли на среде Вильсон — Блера не всегда; рост отсутствовал на той же среде, лишенной сернистокислого натрия, т. е. с железом.

Добавление в среду только сульфита не оказывало тормозящего действия ни на аэробов, ни на анаэробов, правда, рост был несколько хуже, чем на контроле — МПА или только на основе среды Вильсон — Блера (МПА + глюкоза).

Таким образом, опыты выявили токсичность среды Вильсон — Блера для аэробов и тормозящее действие ее на рост Bac. sporogenes и Bac. putrificus и, в несколько меньшей степени, на Bac. perfringens. Было также установлено, что депримирующее действие среды Вильсон — Блера вызывается присутствием в ней железа.

Влияние железа и сульфата на рост бактерий

После того как было установлено, что среда Вильсон — Блера для большинства бактерий является токсичной, а для анаэробных бактерий токсичным является и железо в концентрации, вводимой в среду, следующие опыты были поставлены с различной концентрацией железа и сульфита натрия.

Среда Вильсон — Блера приготовлялась или без сульфита с различными концентрациями железа, или без железа с различными концентрациями сульфита и разливалась для анаэробов в узкие пробирки; для аэробных бактерий среда скашивалась в обычных пробирках.

Как и в предыдущих опытах, для засева употреблялась эмульсия суточной агаровой культуры. Техника засева та же. Из табл. 2 видно,

Таблица 1

Влияние отдельных компонентов среды Вильсон—Блера на рост бактерий

Вид бактерий	№ опыта	Среда Вильсон—Блера	Среда Вильсон—Блера			МПА
			без железа	без сульфита	без железа и сульфита	
Bac. subtilis	1	—	++	++	++++	++++
	2	—	++	++	++++	++++
	3	++	++	++	++++	++++
Bac. mesentericus	1	—	++	++	++++	++++
	2	—	++	++	++++	++++
	3	—	++	++	++++	++++
Bac. megatherium	1	—	++	++	++++	++++
	2	—	++	++	++++	++++
	3	—	++	++	++++	++++
Bac. mycoides	1	—	++	++	++++	++++
	2	—	++	++	++++	++++
	3	—	++	++	++++	++++
Staphylococcus albus	1	—	++	++	++++	++++
	2	—	++	++	++++	++++
	3	—	++	++	++++	++++
B. coli	1	Рост на 3 сутки ++	++	++	++++	++++
	2	++	++	++	++++	++++
	3	++	++	++	++++	++++
B. proteus	1	++	++	++	++++	++++
	2	++	++	++	++++	++++
	3	—	++	++	++++	++++
Bac. perfringens	1	++	++	—	++++	++++
	2	++	++	—	++++	++++
	3	—	++	—	++++	++++
Bac. sporogenes	1	++	++	—	++++	++++
	2	—	++	—	++++	++++
	3	—	++	—	++++	++++
Bac. putrificus	1	++	++	—	++++	++++
	2	—	++	—	++++	++++

Примечание. ++++ хороший рост; ++ рост; — нет роста.

что при повышении концентрации железа в два раза по сравнению с количеством его в среде Вильсон — Блера рост микробов, анаэробов и аэробов отсутствовал совершенно. Для анаэробных бактерий в большинстве случаев отсутствие роста, как и в первой серии опытов, наблюдалось также при концентрации железа, обычно вводимой в среду Вильсон — Блера. При понижении концентрации железа в два раза анаэробные бактерии не всегда давали рост, но всегда росли при снижении количества железа до 16,6 мг/л, т. е. в десять раз меньше, чем в среде Вильсон — Блера. Аэробные бактерии давали хороший рост уже при снижении концентрации железа в два раза. Изменение концентрации

Таблица 2

Влияние различной концентрации железа (в среде Вильсон — Блера) на рост бактерий

Вид бактерий	№ опыта	Fe в мг/л								
		16,6	83	166	332	498	664	830	1660	Контроль
Bac. subtilis	1	+++	++	+++	—	—	—	—	—	++++
	2	+++	—	—	—	—	—	—	—	+++
	3	++++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
Bac. mesentericus	1	+	+++	++++	—	—	—	—	—	++++
	2	+++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	+++	++	++	—	—	—	+++
Bac. megatherium	1	+++	+++	++	—	—	—	—	—	+++
	2	+++	+++	++	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	—	++	—	—	—	—	++++
Bac. mycoides	1	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
	2	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
Staphylococcus albus	1	++++	+++	+++	—	—	—	—	—	++++
	2	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
B. coli	1	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
	2	+++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
B. proteus	1	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
	2	+++	+++	+++	++	++	—	—	—	+++
	3	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	+++
Bac. perfringens	1	+++	+++	++++	—	—	—	—	—	++++
	2	++++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	—	+++	—	—	—	—	—	++++
Bac. sporogenes	1	+++	—	—	—	—	—	—	—	+++
	2	+++	—	—	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	++++
Bac. putrificus	1	+++	+++	—	—	—	—	—	—	++++
	2	+++	+++	—	—	—	—	—	—	+++
	3	+++	—	+++	—	—	—	—	—	++++

Примечание: — нет роста; ++ рост слабый; +++ рост; ++++ хороший рост.

сульфита заметно не влияет на рост анаэробных и аэробных бактерий — при различной концентрации сульфита наблюдается рост микробов.

Известно, что железо необходимо для развития микроорганизмов не только как стимулятор роста, но и как обязательный компонент; отсутствие его в среде прекращает рост организмов.

Подробными исследованиями Успенского [3] выяснено влияние железа на развитие и рост водорослей и установлены оптимальные концентрации для отдельных видов водорослей, они лежат между 0,14 — 1,40 мг Fe/л.

В литературе отсутствуют достаточно подробные указания относительно концентраций железа, наиболее благоприятных для развития бактерий.

Большинство авторов, исследовавших влияние солей железа на бактерии, отмечают ядовитое действие железа уже при очень малых концентрациях его.

Так Hotchkiss [6] сообщает, что содержание железа в среде в количестве 56,0 мг/л подавляет рост B. coli, но не всегда подавляет в концентрации 28 мг/л. Loew и Kozac [2] приводят данные о стимулирующем действии ферроцианидов (в количестве 15 мгFe/л) на рост B. prodigiosum, но не других бактерий.

На основании литературных данных и результатов наших исследований можно было предположить, что, снизив концентрацию железа в среде Вильсон — Блера до 16,6 мг/л, мы избежим его токсического действия и создадим более благоприятные условия для роста бактерий. Опыты, поставленные в этом направлении, подтвердили предположение и показали, что концентрация железа 16,6 мг/л является оптимальной — анаэробные бактерии всегда давали рост. Колонии микробов были окрашены в серый цвет.

В заключение считаю своим долгом принести благодарность проф. А. А. Имшенецкому за консультации, полученные в процессе работы.

Выводы

1. Среда Вильсон — Блера задерживает, а иногда и совсем парализует развитие бактерий как аэробных, так и анаэробных.
2. Депримирующим компонентом в среде Вильсон — Блера является железо, вводимое в среду в концентрации 166 мг/л.
3. При повышении концентрации железа в два раза по сравнению с количеством его, входящим в состав среды Вильсон — Блера, рост как аэробов, так и анаэробов всегда отсутствует.
4. Понижение количества железа в два раза заметно не снижает токсичности среды.
5. При снижении концентрации железа в десять раз (до 16,6 мг/л) анаэробные бактерии всегда дают интенсивный рост.
6. Снизив количество железа в среде Вильсон — Блера до 16,6 мг/л, получаем дифференциальную среду, не тормозящую роста анаэробных бактерий.

Колонии анаэробов окрашиваются на этой среде не в черный цвет, как на обычной среде Вильсон — Блера, а в серый цвет.

Центральная санитарно-гигиеническая лаборатория
Москва

Получено 10.V.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Миллер А. А. Санитарная бактериология. Медгиз, М.—Л., 1935.
2. Минкевич И. Е. Учение о Bact. coli commune как санитарно-показательном организме. Изд. Воен.-мед. Академии, Ленинград, 1936.
3. Успенский Е. Е. Железо как фактор распределения водорослей. Труды Ботанического института. Москва, 1925.
4. Черникова Н. Г. Испытание среды Робинзон — Стоваля для обнаружения Bac. perfringens. Журн. микроб., эпид. и иммунолог., № 10—11, 1941.
5. Buchanan R. and Fulmer E. Physiology and Biochemistry of bacteria, v. II, p. 411, 1930.
6. Hotchkiss. Studies on salt action. J. Bact., v. VIII, p. 141, 1923.

[2] Цитируется по Buchanan и Fulmer (5).

КОНСЕРВИРОВАНИЕ КЛЕЕВ АНТИСЕПТИКАМИ

П. Я. Мизин и Л. И. Воронина

В практике хранения документальных материалов часто приходится сталкиваться с необходимостью применения различных клеев. Последние употребляются при брошировке, реставрации и переплете документов и книг. Применяемый клей является хорошей питательной средой для целого ряда микроорганизмов. Обычно это клей растительного или животного происхождения. Присутствие в документах клея, не защищенного антисептиками, создает при хранении в отдельных случаях благоприятные условия для поселения на них различных плесеней и насекомых. Это обстоятельство, безусловно, намного сокращает срок сохранности документа.

В связи с этим были попытки защитить клей от микроорганизмов введением в него различных антисептиков. В числе их применялись формалин, тимол, сернокислая медь и т. д.

Максимова применяла для консервирования рыбного клея смесь уксусной кислоты и медного купороса.

Практика показала, что защитные качества этих антисептиков в малых концентрациях незначительны. Формалин же летуч, следовательно, на долгий срок защищать клей не будет.

Нами проводилось изучение защитных свойств ряда антисептиков, в результате которого установлено, что для этих целей наиболее подходит β-нафтол, отвечающий ряду специфических требований. Почти пятилетняя практика применения позволила определить ряд его положительных свойств.

Задача нашей работы сводилась к тому, чтобы еще раз проверить антисептические свойства различных веществ, выявить лучшие и установить оптимальные количества, необходимые для консервирования клея.

Методика

Для работы были взяты три вида клея: животный (костный), мучной и декстриновый. Клей, приготовленный по определенному рецепту, разливался по колбам (объемом 500 см^3) по 100 см^3 на каждую колбу. После этого в клей вводился раствор взятого нами антисептика, а клей тщательно перемешивался, чем достигалось равномерное распределение антисептика в массе клея. После того как клей немного застывал, на его поверхность наносились конидии Sterigmatocystis или вносилось небольшое количество почвы в некоторых опытах. Контролем служили колбы с клеем, засеянным конидиями, но не защищенным антисептиком. За колбами устанавливалось наблюдение и день появления роста мицелия, а также его дальнейшее развитие фиксировались в журнале. Концом опыта условились считать 30-й день со дня постановки опыта.

Консервирование декстринового клея

Для консервирования декстринового клея были испытаны следующие антисептики: сернокислый цинк, хлористый барий, уротропин и β-нафтол.

Результаты, полученные в опытах, приведены в табл. 1.

Из приводимой таблицы видно, что необходимым требованиям отвечает только β-нафтол. Все остальные антисептики во взятых нами концентрациях не задерживали роста микроорганизмов даже в первые дни.

Таблица 1

Концентрация антисептика в %	Сернокислый цинк		Хлористый барий		Уротропия		β-нафтол	
	день появления роста	рост через 30 дней	день появления роста	рост через 30 дней	день появления роста	рост чере 30 дней	день появления роста	рост через 30 дней
5	8	+++	2	++++	2	++++	—	—
1	5	++++	2	++++	2	++++	—	—
0,9	5	++++	2	++++	2	++++	—	—
0,18	2	++++	2	++++	2	++++	—	—
0,018	2	++++	2	++++	2	++++	30	+
0,0018	2	++++	2	++++	2	++++	3	++++
Контроль	2	++++	2	++++	2	++++	2	++++

Примечание: — роста нет; + очень слабый рост; ++ слабый рост; +++ сильный рост; ++++ очень сильный рост.

В клее, защищенном β-нафтолом, микроорганизмы не дали роста и к концу опыта (опыт длился в течение месяца). Если учесть то обстоятельство, что условия проведения опыта были оптимальными для развития микроорганизмов (влажность клея поддерживалась на довольно высоком уровне), то можно сделать вывод, что в менее благоприятных для микробов условиях β-нафтол будет полностью защищать клей от поселения на нем микроорганизмов.

Оптимальной концентрацией β-нафтола нужно считать 0,18%, т. е. 0,18 г β-нафтола на 100 г сухого клея.

Консервирование животного (костного) клея

Для работы с животным клеем были использованы следующие антисептики: фтористый натрий, медный купорос, сернокислый кадмий, дициандиамид и β-нафтол.

Результаты опытов видны из табл. 2.

Нужно сказать, что концентрации, указанные в таблице, взяты не произвольно, а в зависимости от степени растворимости выбранных нами антисептиков.

Опыты были поставлены одновременно и уже в скором времени можно было регистрировать результаты. Из взятых нами веществ защитными свойствами обладает только β-нафтол. В первой повторности в качестве инфекции употреблялись споры Sterigmatocystis.

Во второй повторности опыты проводились только с β-нафтолом. В этом случае источником инфекции служила почва.

Для введения β-нафтола в клей мы пользовались его спиртовым раствором (10%), следовательно, по необходимости в клей вводился и спирт.

Для выяснения того, какое действие окажет спирт на микроорганизмы, были поставлены контрольные опыты с одним спиртом в тех же концентрациях, в каких он вводился вместе с β-нафтолом. Результаты показали, что спирт в данных концентрациях совершенно не защищает

Таблица 2

Концентрация антисептика в %	$CdSO_4$		$CuSO_4$		NaF		β-нафтол		Дициандиамид	
	день появления роста гриба	рост через 30 дней	день появления роста гриба	рост через 30 дней	день появления роста гриба	рост через 30 дней	день появления роста гриба	рост через 30 дней	день появления роста гриба	рост через 30 дней
15			11	++++					3	++++
10			3	++++					2	++++
5	20	++	2	++++					2	++++
3					16	++++	—	—		
1,5					16	++++	—	—		
1	10	++	2	++++	11	++++	—	—	2	++++
0,5					3	++++	8	+		
0,25							8	++		
0,1	3	++++					3	+++		
0,01	3	++++					3	++++		
Контроль	3	++++	2	++++	3	++++	2	++++	2	++++

клей от развития в нем микроорганизмов. Следовательно, результаты, полученные в серии с β-нафтолом, можно отнести только за счет антисептических свойств последнего.

Необходимо еще упомянуть об одном обстоятельстве. Во второй повторности, когда клей заражался почвой, почти во всех чашках в местах соприкосновения почвы с клеем произошло легкое разжижение. При микроскопировании клея с этих участков были обнаружены бактерии, которые и вызывали разжижение. Это, конечно, нежелательное явление, но, думается, что оно не должно нас смущать и вот по каким причинам.

В условиях опыта клею не давалась возможность подсыхать. Влажный же субстрат способствовал развитию бактерий. При хранении книг и документов клей не будет иметь значительной влажности, чем и исключается возможность процесса развития и деятельности бактерий.

Из таблицы видно, что максимальной концентрацией, задерживающей рост, является — 1% β-нафтола к сухому весу клея.

Консервирование мучного клея

Используя результаты, полученные при работе с декстриновым и столярным клеями, мы решили для опытов с мучным клеем в качестве антисептика взять только β-нафтол. Для опытов брался клей из пшеничной муки.

Результаты, полученные из опытов, отражены в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация 10% спиртового раствора β-нафтола в $см^3$	День появления роста гриба	Рост через 30 дней
1,25	—	—
1	—	—
0,75	—	—
0,5	13	++
0,25	7	+++
Контроль	2	++++

Из таблицы видно, что задерживающей концентрацией в данном случае будет — 0,75 см³ раствора. В пересчете на сухой вес это составит 0,37% β-нафтола к сухому весу клея.

Выводы

1. Изучение консервирующего действия различных антисептиков производилось на трех видах клея: декстриновом, мучном и животном.
2. В процессе работы были испытаны следующие антисептики: фтористый натрий, сернокислая медь, сернокислый кадмий, хлористый барий, сернокислый цинк, уротропин, дициандиамид и β-нафтол.
3. Лучшими свойствами из всех испытанных антисептиков обладает β-нафтол. Оптимальными концентрациями β-нафтола являются следующие: для декстринового клея — 0,18%, для мучного клея — 0,37%, для животного клея — 1%.

Москва *Получено 27.V.1947*

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СЛИЗИСТОГО БАКТЕРИОЗА КАПУСТЫ ERWINIA AROIDEAE (TOWS) HOLLAND В ПОЧВЕ

И. В. Воронкевич

Вопрос выживаемости фитопатогенных бактерий в почве до сих пор остается недостаточно исследованным. Почва и сейчас часто считается одним из важнейших источников распространения инфекции.

Однако рядом работ последних лет доказано, что такие бактерии, как Pseudomonas tabacum, Ps. mori, Xanthomonas citri , Xanth. malvacearum, Erwinia amilovora и другие не могут долго сохраняться как непосредственно в почве, так и в растительных остатках, подвергшихся разложению. Они могут сохраняться только в неперегнивших растительных остатках. Доказано, что большинство бактерий, патогенных для человека и животных, быстро погибают в почве [3]. Исключение представляют лишь стойкие спороносные виды. Поведение фитопатогенных бактерий в почве, повидимому, близко к поведению микробов, патогенных для человека и животных.

Причиной гибели их в почве могут явиться почвенные микробы антагонисты или бактериофаг, который был описан для ряда фитопатогенных бактерий [1, 2, 4, 5, 6, 7]. Кроме биологических факторов, действующих губительно на патогенных микробов, важное значение имеет характер самой почвы, именно ее способность к физической адсорбции. Бактерии из сточных вод исчезают быстрее при наличии тяжелой глинистой почвы, песчаная же почва обладает меньшей способностью удалять микробов из загрязненных вод [3].

При исследовании сохраняемости бактерий в почве следует разделять вопросы перезимовки и выживаемости при температурах, благоприятных для прохождения жизненных процессов. В первом случае, при действии температур ниже нуля, может прекращаться или замедляться как деятельность самих возбудителей бактериозов, так и факторов, их угнетающих. Наибольший интерес представляет вопрос о возможности для фитопатогенных бактерий сохраняться и накопляться в почве при температурах оптимальных или близких к таковым для деятельности как растения, так и паразита.

При изучении источников инфекции капусты слизистым бактериозом (Erwinia aroideae) нами было установлено, что возбудитель этого заболевания не может долго жить в почве. Методика опытов была следующая: в колбы Эрленмейера со стерильной и нестерильной почвой вносилась водная суспензия из чистых, патогенных культур Erw. aroideae, выделенных из капусты, больной слизистым бактериозом. Суспензия вносилась в количестве около 500 млн. бактерий на 1 г почвы. Через определенные промежутки времени бралось по две колбы и почва в них испытывалась на наличие там бактерий. Испытание проводилось на капустной рассаде. Предварительно поврежденные стерильной иглой листочки рассады опускались в стаканчик с почвой, разведенной стерильной водой. Контролем служили листочки, опущенные в стерильную воду. Наличие в почве жизнеспособных бактерий определялось по появлению на листочках рассады темных маслянистых пятен легко разрушающейся ткани. Опыты проводились в оптимальных температурных условиях (23—26°).

Этими опытами установлено, что возбудитель слизистого бактериоза (Erw. aroideae) в нестерильной почве очень быстро погибает [1]. Уже на 15-й день на листочках не появлялось признаков заражения, в стерильной же почве инфекция сохранялась до 9 месяцев. Полученные данные приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Выживаемость Erw. aroideae в стерильной и нестерильной почве

Почва	Испытание через									
	5 суток	10 суток	15 суток	20 суток	30 суток	3 мес.	4½ мес.	6½ мес.	7 мес.	9 мес.
Нестерильная . .	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Стерильная . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: + бактерии в почве живы, — они погибли.

Сохранение бактерий в стерильной почве указывает на то, что гибель их происходит в результате жизнедеятельности почвенных микробов или бактериофага.

Продолжительность жизни бактерий в почве может зависеть от многих причин, к которым относятся температура, количество бактерий в почве, свойства самой почвы.

Влияние температуры на продолжительность сохраняемости инфекций в нестерильной почве изучалось нами в политермостате при шести градациях температуры. Суспензия бактерий вносилась из расчета около 200 млн. бактерий на 1 г почвы. В остальном методика была та же, что и в первом опыте.

Полученные данные приводятся в табл. 2.

Таблица 2

Выживаемость Erw. aroideae в почве при разных температурах

Сроки заражения рассады	Температура, при которой бактерии росли					
	35—38°	31—32°	22°	17°	10—12°	0—1°
Через 1 сутки	+	+	+	+	+	+
» 2 суток	—	—	+	+	+	+
» 5 »	—	—	+ следы	+	+	+
» 7 »	—	—	—	+	+	+
» 12 »	—	—	—	+ следы	+	+
» 21 сутки	—	—	—	—	—	+
» 42 суток	—	—	—	—	—	—

Как видно, с понижением температуры намечается тенденция к увеличению времени сохраняемости инфекции в почве.

При 31—38° инфекция сохранялась в почве только в течение одних суток, в то время как при более низких температурах бактерии погибали только через 42 дня. Вероятно, при низких температурах действие лизирующего фактора становится более замедленным, бактерии же сохраняют свою жизнеспособность.

[1] Опытами 1947 г. установлено, что Erwinia carotovora (Jones) Holland также быстро погибает в нестерильной почве. В некоторых случаях гибель происходила через 3—10 дней.

Значение характера почвы для сохранения в ней Erwinia aroideae изучалось на образцах суглинистой почвы со ст. Икша Дмитровского района. Контролем служила парниковая, богатая органическими веществами почва, с которой мы проводили все опыты [2]. Казалось также интересным проследить влияние возделываемой культуры и степени обработки почвы на выживаемость бактерий. Для установления этого было взято 4 вида почв, перечисленных в табл. 3.

Таблица 3

Выживаемость Erw. aroideae в разных образцах почв

Характер почвы	Испытание через					
	1 час	20 час.	3 суток	5 суток	7 суток	10 суток
Почва с нераспаханной залежи	—	—	—	—	—	—
Почва из-под злаков		—	—	—	—	—
Почва из-под картофеля		+	+	—	—	—
Почва с проезжей дороги		+	+	+	+	—
Парниковая почва	+	+	+	+	+	—

Из приведенных данных видно, что продолжительность сохранения бактерий в испытуемых почвах была различной. В почвах с нераспаханной залежи и из-под злаков бактерии не обнаруживались уже через 1 час и 20 часов, что, повидимому, можно объяснить способностью глинистых почв к адсорбции [3].

В почвах из-под картофеля бактерии сохраняли жизнеспособность в течение 3 суток, в почве же с проезжей дороги — 7 суток (так же, как в парниковой).

Быстрота исчезновения патогенных микробов может зависеть также от количества бактерий в почве. Опыт по этому вопросу был поставлен по следующей методике: в навески почвы была внесена (по 2 $см^3$) бактериальная суспензия, содержащая около 2 млрд. микробных тел в 1 $см^3$. Для каждого следующего варианта бактериальная суспензия последовательно разбавлялась водой в 3 раза. Следовательно, для первого варианта количество бактерий в пересчете на 1 г почвы было 300 млн., для второго — 100 млн., для третьего — 30 млн. и для четвертого — 10 млн.

В табл. 4 приводятся результаты этого опыта.

Таблица 4

Сохраняемость бактерий в почве в зависимости от их количества

Количество бактерий в млн. на 1 г почвы	Испытание через				
	20 час.	2 суток	3 суток	5 суток	7 суток
300	+	+	+	+	—
100	+	+	+	—	—
30	+	+	+	—	—
10	+	—	—	—	—

Из таблицы видно, во-первых, что даже такое количество, как 10 млн. микробных тел на 1 г почвы, способно вызывать инфекцию в пер-

[2] Бактерии вносились в количестве около 500 млн. микробных тел на 1 г почвы

вые часы после внесения микробов, но не вызывает инфекции уже через двое суток.

В случаях, если почва насыщена большим количеством бактерий, они в ней сохраняются дольше. В нашем опыте до 5 дней.

Для изучения взаимоотношения между нашими культурами Erw. aroideae и некоторыми почвенными сапрофитными бактериями делались посевы изучаемых культур на агаровые пластинки взаимно пересекающимися перпендикулярными штрихами. Из почвенных бактерий были взяты следующие: Bacillus mesentericus vulgatus Flügge, Bac. mycoides Flügge, Bac. subtilis Cohn., Bacterium prodigiosum Lehm. et Neum.

После двух суток роста производился просмотр пластинок, причем ни в одном случае не было заметно задерживающего действия почвенных микробов на наши культуры Erwinia aroideae. Они росли так же хорошо, как и почвенные бактерии. При этом в местах соприкосновения штрихов наблюдался совместный рост испытуемых бактерий. Влияния на патогенность наших культур Erw. aroideae эти почвенные микробы также не оказали. После двадцати суток совместного роста на агаровых пластинках [3] с них делался смыв и затем заражение листочков капустной рассады. Во всех случаях имело место характерное поражение растений.

Повидимому, обычные почвенные бактерии, которые были у нас в испытаниях, не оказывают угнетающего действия на рост и патогенность Erw. aroideae.

На основании всех проведенных опытов и некоторых литературных данных можно предположить, что почва не является благоприятной средой для многих фитопатогенных бактерий. В медицинской бактериологии давно отказались от взгляда на почву как на носителя инфекции.

При пересмотре вопроса сохраняемости возбудителей растительных бактериозов, повидимому, многие из них окажутся неспособными сохраняться в почве. Вопрос о причинах гибели там бактерий должен быть детально исследован, так как в этом направлении еще пока мало сделано. Существующие же работы почти всегда носят отрывочный характер и всестороннего освещения вопроса о сохраняемости фитопатогенных бактерий в почве и причинах их гибели там не имеется.

Выводы

1. Возбудитель слизистого бактериоза Erwinia aroideae (а также Erwinia carotovora) сохраняется в нестерильной почве только в течение 3—10 дней (при оптимальной температуре), тогда как в стерильной способные вызывать инфекцию бактерии были обнаружены в период до 9 месяцев.

2. Продолжительность сохранения Erw. aroideae в почве зависит от температуры. При 31—38° инфекция сохранялась в почве только в течение суток, тогда как при температуре таящего снега бактерии погибали только через 42 дня.

3. Скорость исчезновения бактерий из почвы связана с характером последней, что, повидимому, зависит от различной способности почв к адсорбции. В наших опытах в глинистых почвах бактерии уже не обнаруживались через один час после их внесения туда.

4. Быстрота исчезновения патогенных микробов из почвы зависит от того, какое количество их там находится. Чем больше почва насыщена бактериями, тем более длительный срок они там обнаруживаются.

---

[3] Посев на агаровые пластинки производился разливкой смеси культур почвенных бактерий и Erw. aroideae.

5. Обычные почвенные сапрофиты — Bac. mesentericus, Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bact. prodogiosum — не оказали угнетающего действия на рост и патогенность Erw. aroideae.

Лаборатория бактериозов Московского филиала Всесоюзного института защиты растений

Получено 14. V. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян А. А. Перезимовка возбудителя гоммоза хлопчатника в полевых условиях. Ереван, 1939.
2. Бибердиева М. П. О бактериофаге B. mori — возбудителя бактериоза шелковицы. Микробиология, т. V, вып. 4, 1936.
3. Ваксман З. А. Антибиотики (лекции, читанные в Академии Наук СССР). Изд. АН СССР. Научно-популярная серия, стр. 1—110, 1946.
4. Вердеревский Д. Д. Гоммоз хлопчатника. Ташкент, 1938.
5. Лебедева О. П. О бактериофаге против Bact. malvacearum E. Smith. Защита растений, № 15, 1937.
6. Хетагурова Ф. В. и Олицкая А. В. К вопросу об антагонизме у бактерий. Известия высших курсов прикладн. зоологии и фитопатологии, вып. XII, 1941.
7. Ячевский А. А. Бактериофаги в применении к фитопатологии. Материалы по микологии и фитопатологии, т. V, вып. 2, 1926.

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА НЕКРОТИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ У NICOTIANA GLUTINOSA

В. Л. Рыжков и *В. А. Смирнова*

В целом ряде работ было показано, что некротическая реакция некоторых видов Nicotiana на проникновение вирусного белка табачной мозаики может быть использована для изучения физиологических условий саморепродукции этого белка (Рыжков и Сухов [2]; Рыжков, Смирнова и Городская [3]; Woods [6]). В настоящей работе изучалось влияние некоторых катионов на упомянутую выше некротическую реакцию. Известно, что катионы обладают очень сильным действием на протоплазму и тем самым разносторонне влияют на физиологические процессы. Роль отдельных катионов часто весьма специфична. Влияние катионов на реакции, связанные с проникновением вируса, до сих пор изучались только в отношении бактериальных вирусов (бактериофагов), причем Gerst [4], Wahl [5] показали, что это влияние иногда может быть весьма существенным. Тем более важным было произвести соответствующие исследования в отношении фитопатогенных вирусов.

В настоящей работе применялся разработанный нами ранее метод количественного учета. Листья N. glutinosa натирали соком, содержащим вирус, после чего их укрепляли горизонтально при помощи проволоки в чашках Коха таким образом, чтобы ровно половина листа по средней жилке была погружена в испытуемый раствор, а половина листа оставалась над раствором. Сравнивалось число некрозов на половинку листа над раствором и в растворе. Кроме того всегда ставился контрольный опыт, в котором половинки листа погружались в водопроводную воду. Из табл. 1 видно, что в воде в среднем развивается

Таблица 1

Число некрозов, развивающихся в воде и над водой

Дата	Контроль	Опыт	Число повторностей	Отношение контроля к опыту
3/VII	212	157	6	1,35
4/VII	62	36	6	1,72
14/VII	182	204	9	0,89
15/VII	487	376	7	1,29
24/VII	128	103	7	1,24
2/IX	320	318	9	1,00
6/IX	188	112	9	1,67
9/IX	163	127	10	1,27
16/IX	62	58	8	1,06

несколько меньше некрозов, чем над водой, однако это различие незначительно.

Таблица 1 очень поучительна, так как дает понятие о том, как вариирует от опыта к опыту число некрозов. Эти вариации зависят как от различной чувствительности разных листочков, так и от различия в

температурных условиях данного опыта. Среднее отношение контроля к опыту по всем приведенным экспериментам равняется 1,21. Эта величина, полученная на основе многочисленных экспериментов, показывает, что в водопроводной воде развивается несколько меньше некрозов, чем на воздухе.

В табл. 2 приводятся данные о влиянии различных электролитов на развитие некрозов. Из этой таблицы видно, что погружение листа в децимолярные растворы азотнокислого кальция или азотнокислого натрия не отражается на развитии некрозов иначе, чем погружение их в водопроводную воду, тогда как соли калия и магния, взятые в той же молярности, а также 0,01% раствор сернокислого цинка очень сильно подавляют некрозы. Особенно это действие выражено у солей магния. Так, в опыте от 4/VII в растворе сернокислого магния было получено только 5 некрозов на 10 половинок листа, и отношение контроля к опыту достигало 91. В этом случае мы вправе говорить о почти полном подавлении некротической реакции.

Таблица 2

Влияние электролитов на некротическую реакцию

Дата	Характер опыта	Контроль	Опыт	Число повторностей	Отношение контроля к опыту
25/V	0,1 *M* $Ca(NO_3)_2$	196	182	8	1,06
27/VI	0,1 *M* $Ca(NO_3)_2$	470	392	8	1,19
14/VII	0,1 *M* $NaNO_3$	141	112	6	1,25
25/V	0,1 *M* KNO_3	200	47	8	4,27
13/IX	0,1 *M* KNO_3	129	16	10	8,06
16/IX	0,1 *M* KNO_3	80	5	9	16,0
4/VI	0,01% $ZnSO_4$	110	13	4	8,46
1/VII	0,01% $ZnSO_4$	382	11	13	34,72
4/VII	0,1 *M* $MgSO_4$	455	5	10	91,00
4/VII	0,1 *M* $Mg(NO_3)_2$	106	2	6	53,00

Сильные колебания в отношении контроля к опыту, которые мы находим как в табл. 2, так и в рассматриваемой далее табл. 3, зависят, повидимому, от того, что число некрозов на воздухе по приведенным выше причинам значительно вариирует, а число некрозов в растворе, подавляющем их развитие, всегда довольно незначительно. Поэтому чем меньше чувствительность листочков данной серии и чем меньше они развивают некрозов над раствором, тем меньшее значение приобретает отношение контроля к опыту и наоборот.

Сравнение рассматриваемых здесь отношений при погружении листьев в воду и при погружении их в соответствующие растворы солей, однако, не оставляет никакого сомнения в резко выраженном тормозящем эффекте этих солей на некротическую реакцию.

Из классических работ Леба [1] и многочисленных других авторов известен так называемый антагонизм ионов, выражающийся в том, что ионы, из которых каждый в отдельности оказывает одинаково вредное действие на определенный физиологический процесс, будучи смешаны в известных соотношениях, взаимно парализуют этот вредный эффект. С целью выяснить, не имеет ли место означенный антагонизм ионов и при действии их на некротическую реакцию, мы погружали листья N. glutinosa в смеси децимолярных растворов азотнокислого калия и магния в различных соотношениях. Результаты этих опытов полностью приведены в табл. 3. Из этой таблицы видно, что в подавляющем большинстве случаев смеси этих растворов тормозят развитие некрозов, подобно тому как и каждый из них в отдельности. Только в

некоторых случаях при отношении названных солей 7 : 1 мы наблюдали исчезновение тормозящего эффекта, однако этот результат не был постоянным, и в опыте от 2/IX он не наблюдался, поэтому мы считаем существование антагонизма в действии ионов на некротическую реакцию недоказанным.

В настоящее время трудно объяснить, почему некоторые катионы обладают способностью резко подавлять некротическую реакцию. Исходя из того, что ионы кальция ее не подавляют, а ионы калия подавляют, можно было бы думать, что подавление некротической реакции связано с известным разжижением протоплазмы, однако такое объяснение все же недостаточно, так как ионы натрия действуют подобно кальцию, хотя они и неспособны уплотнять протоплазму и скорее, как и калий, должны были бы ее разжижать. Известно, что роданистые соединения способствуют разжижению протоплазмы, однако наши опыты показали, что однопроцентный раствор роданистого аммония не подавляет развития некрозов.

Было сделано предположение, что для развития некрозов необходим кальций и что подавление их зависит от способности соответствующих ионов вытеснять кальций. Были сделаны попытки перевести кальций, содержащийся в листе, в нерастворимое состояние путем погружения в 0,01% раствор щавелевой кислоты или 0,001% раствор фосфорной кислоты. В растворах этих кислот некротическая реакция наступала нормально. Таким образом, мы не получили подтверждения и этой гипотезы.

То обстоятельство, что мы не можем объяснить причины специфического влияния известных ионов на некротическую реакцию, не может нас удивлять. Этот эффект лишь недавно открыт, а мы знаем, что другого рода многообразные специфические влияния ионов, давно известные науке, остаются необъясненными. Мы не знаем, например, от чего зависит наркотизирующий эффект солей магния на нервную систему животных.

Таблица 3

Влияние смеси децимолярных растворов KNO_3 и $Mg(NO_3)_2$ на некротическую реакцию

Дата	Характер смеси	Контроль	Опыт	Число повторностей	Отношение контроля к опыту
13/VII	$^1/_2$ KNO_3 + $^1/_2$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	520	23	8	22,60
13/VII	$^7/_8$ KNO_3 + $^1/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	568	344	6	1,65
9/IX	$^7/_8$ KNO_3 + $^1/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	165	105	10	1,58
2/IX	$^7/_8$ KNO_3 + $^1/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	50	3	7	16,66
2/IX	$^6/_8$ KNO_3 + $^2/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	45	7	5	6,42
2/IX	$^5/_8$ KNO_3 + $^3/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	137	13	6	10,53
2/IX	$^4/_8$ KNO_3 + $^4/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	88	9	5	9,77
2/IX	$^3/_8$ KNO_3 + $^5/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	145	8	7	18,12
2/IX	$^2/_8$ KNO_3 + $^6/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	152	17	7	8,94
2/IX	$^1/_8$ KNO_3 + $^7/_8$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	84	16	7	5,25
22/VII	$^{15}/_{16}$ KNO_3 + $^1/_{16}$ $Mg(NO_3)_2$ . .	58	32	4	1,81
22/VII	$^1/_4$ KNO_3 + $^3/_4$ $Mg(NO_3)_2$ . . .	187	38	10	4,92
13/IX	0,95 KNO_3 + 0,05 $Mg(NO_3)_2$.	207	22	11	9,40
13/IX	0,90 KNO_3 + 0,10 $Mg(NO_3)_2$.	188	32	10	5,87
13/IX	0,85 KNO_3 + 0,15 $Mg(NO_3)_2$.	325	75	10	4,34
13/IX	0,80 KNO_3 + 0,20 $Mg(NO_3)_2$.	152	40	10	3,80

Из наших предыдущих работ известно, что различные ингибиторы некротической реакции действуют только в том случае, если они поступают в ткани вскоре после инокуляции листа вирусом. Такие же

отношения мы наблюдаем и при действии азотнокислого калия. Наши опыты показали, что тормозящий некрозы эффект выражен только в том случае, если листочки погружаются в децимолярный раствор KNO_3 вскоре после заражения. Уже через 6 часов после заражения названный раствор не оказывает никакого действия на развитие некрозов. Эти опыты показывают, что торможению подвергается первая фаза действия вируса. Возможно, что речь идет о понижении чувствительности растения к вирусу, а может быть, также задерживается и процесс его саморепродукции.

Независимо от того, как будут решены в дальнейшем вопросы, возникшие в связи с обнаруженным нами явлением, оно заслуживает внимания не только теории, но и практики, так как показывает, что изменения в соотношениях обычно присутствующих в растительных клетках катионов может существенно влиять на восприимчивость растения к вирусному белку.

Выводы

1. Ионы калия, цинка и магния обладают способностью сильно уменьшать число некрозов, развивающихся у N. glutinosa под влиянием вируса мозаичной болезни табака.
2. Ионы кальция и натрия подобным действием не обладают.
3. Погружение листочков N. glutinosa в воду лишь незначительно уменьшает число некрозов.
4. Антагонизм калия и магния при смешении растворов их солей в разнообразных соотношениях с уверенностью установить не удалось, хотя в отдельных опытах некоторые комбинации как будто бы обладали взаимно антагонистичным действием.
5. Способность азотнокислого калия подавлять некротические реакции обнаруживается только в том случае, если листья погружаются в раствор этой соли вскоре после инокуляции. Через 6 часов после инокуляции соли калия не оказывают никакого эффекта на некротическую реакцию.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 6. XII. 1946

ЛИТЕРАТУРА

1. Леб Д. Динамика живого вещества (перевод). Изд. Матезис, Одесса, 1909.
2. Рыжков В. Л. и Сухов К. С. Влияние подавителей и стимуляторов ферментов на некротическую реакцию у N. glutinosa. Биохимия, т. 9, стр. 54, 1944.
3. Рыжков В. Л., Смирнова В. А. и Городская О. С. О механизме подавления саморепродукции вируса мозаичной болезни табака. Биохимия, т. 11, стр. 97, 1946.
4. Gerst H. The effect of inorganic salts on the multiplication of bacterial viruses. J. Inf. Dis., v. 73, p. 158, 1943.
5. Wahl R. Influence de la composition du milieu sur la bacteriophagie. Ann. Inst. Pasteur, v. 72, № 1—2, 1946.
6. Woods M. W. Revercible inhibition of tobacco mosaic virus in living cells with 0.002 molar sodium cyanide. Science, v. VXCI, No. 2300, p. 295, 1940.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ

Wilson P. W. and Burris R. H. **The mechanism of biological nitrogen fixation.** (Механизм биологической фиксации азота), Bact. Rev., v. 11, No. 1, p. 41—73, 1947.

Рассматривая результаты работ последних нескольких лет по механизму азотфиксации, авторы приходят к выводу, что наиболее вероятным промежуточным продуктом является аммиак. Образование окисленных соединений типа гидроксиламина мало вероятно. Авторы останавливаются на последних достижениях по изучению свойств ферментов азотфиксации. Водород специфически угнетает фиксацию азота у азотобактера и у клевера, не влияет на усвоение связанного азота. Создается впечатление, что H_2 и N_2 конкурируют за соединение с энзимом азотфиксации. CO также угнетает фиксацию азота, особенно у клевера, но в этом случае конкуренции с N_2 нет. Наличие Mo в среде является необходимым для процесса азотфиксации у всех азотофиксаторов — бобовых, азотобактера, Cl. pasteurianum. Но разграничить его действие на рост и на фиксацию трудно.

Авторы считают, что между фотосинтезом (восстановление CO_2) и азотфиксацией (восстановление N_2) много общего. Они предлагают схему механизма азотфиксации по типу современных схем механизма фотосинтеза (Рабинович). Водород для восстановления азота может быть взят или из окисляемого субстрата, или из молекул воды. Окислительный механизм азотфиксации авторы считают мало вероятным.

И. Работнова

Mayer J. and Ascher M. **Biological studies on capsulated yeasts.** (Исследования биологии капсульных дрожжей), J. Bact., v. 53, No. 3, p. 283—295, 1947.

Некоторые капсульные небродящие аспорогенные дрожжи образуют крахмал, накапливающийся в капсуле в виде зерен и в среде — в виде раствора. Крахмал обнаруживается раствором Люголя. У других родов, кроме Torulopsis, образование крахмала не найдено. Крахмал образуется при культивировании на полноценном субстрате, т. е. содержащем необходимые ростовые вещества. Необходимым условием для образования крахмала является подкисление среды до pH = 3—4. При соблюдении этих условий источник азота и углерода не имеет значения для образования крахмала. Кроме крахмала образуется другой полисахарид, содержащий 85% пентоз. Этот полисахарид образуется как в кислых, так и в щелочных условиях, когда крахмал не образуется. Опыты на кроликах показали, что вещество капсул не вызывает образования иммунитета.

И. Работнова

Simon E. **The formation of lactic acid by Clostridium acetobutylicum (Weizmann).** (Образование молочной кислоты Cl. acetobutylicum), Archiv. of Biochem., v. 13, No. 2, p. 237—244, 1947.

Автор изучал ацетоно-бутиловое брожение в неестественных условиях с целью вычленить отдельные этапы и промежуточные продукты, не уловимые при нормальном ходе брожения. Исследовалось брожение в присутствии окиси углерода. CO обратимо угнетает брожение растущих культур. Суспензии отмытых клеток в присутствии CO сбраживают сахар в рацемическую молочную кислоту. Пировиноградная кислота в нормальных условиях сбраживается суспензией бактерий в уксусную. В присутствии CO пировиноградная кислота не сбраживается. Гексозодифосфат в нормальных условиях сбраживается суспензией в метилглиоксаль. В присутствии глютациона образуется не метилглиоксаль, а молочная кислота.

И. Работнова

Rees E. **On the effect of aeration and nutrition on cellulose decomposition by certain bacteria.** (О влиянии аэрации и питания на разложение клетчатки некоторыми бактериями), J. of Bact., v. 53, No. 4, p. 389—400, 1947.

Изучалось влияние условий культивирования на разложение клетчатки Sporocytophaga myxococcoides и Cellulomonas sp. Клетчатка давалась в среду в виде тонкой суспензии из фильтровальной бумаги в количестве 0,4%. Потребление клетчатки устанавливалось по убыли ее количества по весу к концу опыта. Опыты велись при непрерывном встряхивании в специальном аппарате и при продувании воздуха. Оба способа выращивания дают одинаковые результаты, но встряхивание практически удобнее продувания (нет опасности заражения, нет испарения среды и т. п.). Sporocytophaga более аэробный организм, чем Cellulomonas. При встряхивании она потребляет в 4 раза больше клетчатки, чем в неподвижной культуре, а Cellulomonas — в 2 раза. В очень тонком слое среды Cellulomonas хуже потребляет клетчатку, чем в более толстом, а Sporocytophaga развивается тем лучше, чем тоньше слой среды. Оптимальное pH для разрушения клетчатки 6,5—7,5. Наилучший источник азота для Cellulomonas мочевина. Для Sporocytophaga она ядовита. Sporocytophaga хорошо потребляет клетчатку на нитратном азоте и на аммонийном, если не брать физиологически кислых солей. KCl не влияет на развитие до концентрации 2,5 г/л. Более высокие концентрации угнетают. Fe стимулирует Sporocytophaga и не влияет на Cellulomonas. Дрожжевой экстракт необходим для Cellulomonas и не требуется для Sporocytophaga. В оптимальных условиях для развития оба вида разлагают клетчатку с одинаковой скоростью.

И. Работнова

Cardon B. P. and Barker H. A. **Amino acid fermentation by Cl. propionicum and Dipl. glycinophilus.** (Брожение аминокислот, производимое Cl. propionicum и Dipl. glycinophilus), Archiv of Biochem., v. 12, p. 165—180, 1947.

В предыдущей работе (см. реферат в журнале Микробиология, т. XVII, вып. 4) авторами были описаны два новых вида бактерий, сбраживающих аминокислоты. В настоящей работе даны новые сведения об обмене веществ у этих бактерий.

Исследовались как растущие культуры, так и отмытые суспензии. Из 15 аминокислот Cl. propionicum сбраживает аланин, серин, треонин, цистеин, кислоты пировиноградную, акриловую, молочную.

$$3CH_3COCOOH + H_2O = CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2$$

$$3CH_2CHCHNH_2COOH + H_2O = CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 3NH_3$$

$$3CH_3CHCHCOOH = 2CH_3CH_2COCH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$$

$$3CH_2CHCOOH + 2H_2O = 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2$$

$$3CH_3CHOHCH_2NH_2COOH + H_2O = CH_3CH_2CH_2COOH + 2CH_3CH_2COOH + CO_2 + 3NH_3$$

Во всех случаях получается брожение с образованием пропионовой кислоты. При сбраживании треонина образуется еще и масляная, повидимому, путем прямого восстановления треонина. При составлении баланса брожения аланина найдено 93% углерода.

Diplococcus glycinophilus сбраживает только глицин с образованием CO_2, NH_3 и уксусной кислоты. Никакие другие вещества не сбраживаются. При исследовании суспензий бактерий в аппарате Варбурга образуется еще и водород. Его образование зависит от парциального давления водорода над суспензией. В атмосфере с 25—30% водорода в аппарате Варбурга водород не образуется.

И. Работнова

Grenfell E., Legge B. and White T. **Microbiological aspects of the submerged culture production of Penicillin on a pilot-plant scale.** (Образование пенициллина с микробиологической точки зрения при глубинном брожении в условиях опытной установки), J. of General Microbiology, v. 1, No. 2, p. 171—186, 1947.

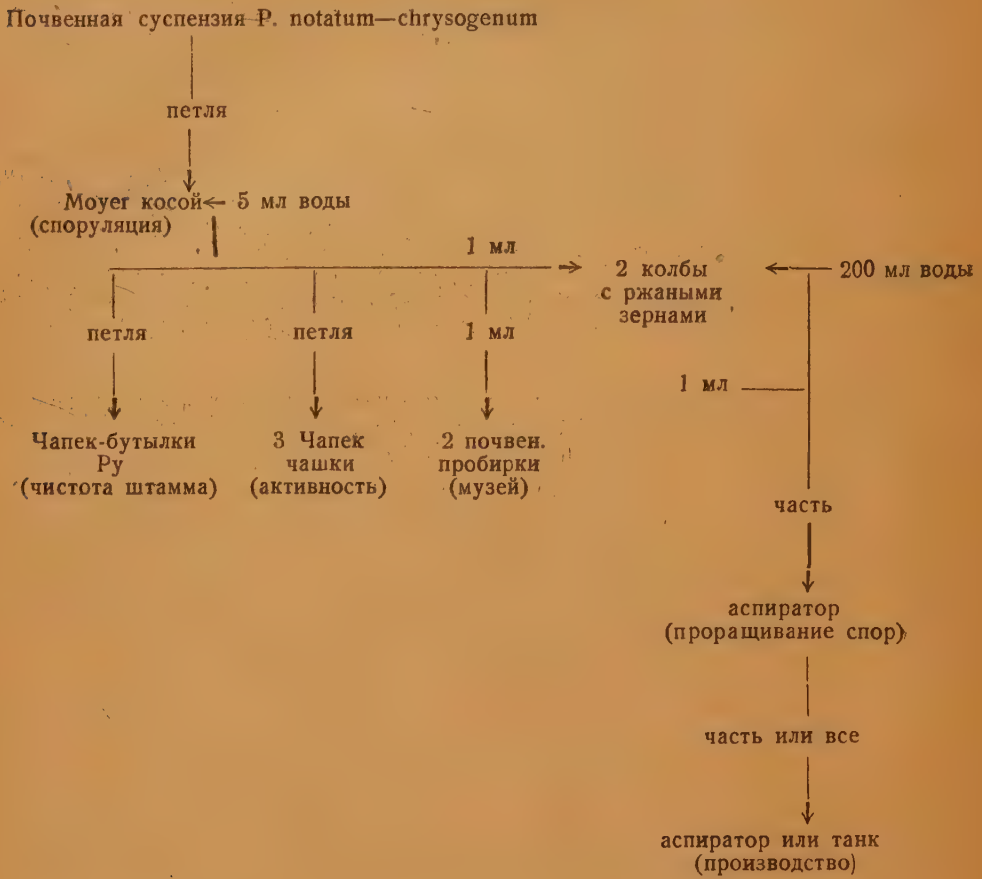
Во введении к статье авторы дают краткое сообщение о результатах работы основных исследователей по важнейшим вопросам пенициллинового производства поверхностными культурами, а затем приводят экспериментальный материал, посвященный этим же вопросам, но при глубинном методе производства пенициллина в условиях опытной установки.

Для удержания пенициллинобразующей способности штамма и устранения спонтанной изменчивости Penicillium авторы рекомендуют хранить последний в пробирках со стерильной почвой при t = 4°.

Учитывая вредное влияние частых пересевов штамма между хранением и производством или между последовательными стадиями хранения, авторы предлагают схему пассажей P. notatum — chrysogenum (см. схему).

Получение больших количеств инокулята для опытной установки достигалось накоплением конидий на ржаных зернах, увлажненных споруляционной средой, и последующим приготовлением из них суспензий (на дестиллированной воде). Было признано необходимым проверить на различных стадиях производства степень спонтанной изменчивости штаммов, их пенициллинобразующую способность и жизнеспособность конидий.

СХЕМА ПАССАЖЕЙ P. NOTATUM—CRYSOGENUM



Для определения пенициллина был предложен усовершенствованный луночный (the cup assay method) метод, погрешность которого равна лишь 5%, и колориметрический метод, позволяющий определять содержание пенициллина в пробе в течение 5 часов.

Н. Авдиевич

Gordon J., Grenfell E., Knowles E., Legge B., Allister R. and White T. **Methods of Penicillin production in submerged culture on a pilot-plant scale.** (Методы образования пенициллина в погруженных культурах в масштабе опытной установки), J. of General Microbiology, v. 1, No. 2, p. 187—202, 1947.

Работа проводилась с P. crysogenum x-1612 и Q-176 (штаммы R и A) в 225-литровом ферментационном сосуде, предназначенном для образования антибиотиков погруженными культурами. В статье даются подробности устройства этого сосуда.

Авторами установлено, что для получения высоких урожаев пенициллина необходимо брать оптимальное количество инокулята, причем последнее для разных штаммов различно. Так, для P. chrysogenum x-1612 на синтетической среде оптимальным является 10^5 проросших конидий на 1 л среды (конидии предварительно проращивались 48 часов). Увеличение количества инокулята в 100 раз дает снижение урожая пенициллина в 4 раза.

Было проведено сравнение питательных сред—«a» (синтетическая) и «b».

Среда «a»		Среда «b»	
Лактоза	15 г	Кукурузно замочная вода	30 мл
Глюкоза	5 »	Лактоза	40 г
Уксусная кислота	4 »	$CaCO_3$	10 »
NH_4NO_3	5 »	Фенилацетамид	0 25 г
KNO_3	3,5 г	Вода	до 1 л
KH_2PO_4	2 »		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0 5 »		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 »		
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 г		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0 005 »		
Фенилацетамид	0,25 »		
Вода	до 1 л		

На среде «a» P. crysogenum x-1612 дает 155 оксф. ед./мл через 115 часов, а Q-176—245 оксф. ед./мл через 95 час. На среде «в» Q-176 дает 400—500 оксф. ед./мл, причем активность пенициллина достигнув максимума, не падает так быстро, как на среде «a». Авторы разрабстали новый метод экстракции пенициллина из культуральной жидкости, позволяющей производить экстракцию при комнатной температуре и не требующий сложного оборудования. Этим методом был получен Ca-пенициллин с активностью 940 оксф. ед./мг.

Н. Авдиевич

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Статьи, посылаемые в редакцию, должны быть по возможности краткими (15—20 стр.) и тщательно отредактированы в рукописи. Никакие исправления в корректуре против рукописи не допускаются.

Рукопись, в том числе примечания и литература, должна быть четко переписана на машинке; на одной стороне листа с двумя интервалами. С левой стороны листа должны быть оставлены чистые поля (3—4 см). Страницы рукописи должны быть перенумерованы единой нумерацией, включая основной текст, таблицы, литературу и т. д. Обозначение за одним номером нескольких страниц (например: 21а, 21б) не допускаются. В конце рукописи должно быть обязательно краткое резюме (выводы), передающее содержание статьи, подпись автора, название учреждения, где была выполнена работа и точный адрес автора.

Таблицы должны быть полностью приведены в соответствующих местах текста. Подзаголовки таблиц должны быть краткими, но их необходимо писать полностью, без сокращений.

Иллюстрации должны быть даны в совершенно отчетливом виде и выполнены на белой бумаге или на кальке в туши. На полях рукописи указывается место рисунка, а в тексте на него дается ссылка. Фотографии печатаются только в случаях абсолютной необходимости, причем они должны быть контрастными и черных тонов. На обороте каждого рисунка должны быть поставлены: фамилия автора, заглавие статьи и страница рукописи, к которой относится рисунок.

Литература. Приводить названия цитируемых работ в тексте статьи или в сносках не разрешается. Вся литература должна быть сведена в особый список, помещаемый в конце статьи. Перечень литературы располагается в алфавитном порядке авторов и нумеруется; для русских и иностранных работ составляются самостоятельные алфавитные списки.

Отдельные работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности; в случае наличия у автора нескольких работ одного года, они нумеруются строчными буквами алфавита (1927a; 1927b; 1927c).

В списках литературы должны даваться нижеследующие данные: а) фамилия, б) инициалы, в) название работы, г) название журнала (для книги — место издания), д) том, страница и год.

Ссылки на литературу в тексте статьи помещаются в скобках с указанием номера по списку литературы.

Никакие сокращения слов, имен, названий как правило не допускаются. Допускаются лишь общепринятые сокращения — мер физических, химических и математических величин и терминов и т. п.

Все меры должны даваться в метрической системе, а температура по шкале Цельсия.

Рукописи, оформленные без соблюдения настоящей инструкции, не будут рассматриваться редакцией.

СОДЕРЖАНИЕ

В. Я. Частухин и М. А. Николаевская. Исследования по экологии грибов, образующих антибиотические вещества I 3

С. А. Баринова. Влияние калия и магния на развитие Rhizopus nigricans и на его способность к кислотообразованию 10

Л. Г. Логинова. Адаптация дрожжей. Брожение, вызываемое дрожжами, адаптированными к высокой температуре 15

Т. Н. Евреинова. Аминокислотный состав белка, выделенного из термофильных бактерий 25

Д. М. Новогрудский. О расселении почвенных бактерий по гифам грибов. 28

М. Д. Чумак. Ацетоно-этиловые бактерии. IV. Изменчивость ацетоно-этиловых бактерий 36

О. К. Настюкова и В. В. Алпатов. Об экологии и физиологии лево- и правозавитых форм Bac. mycoides (Flügge) 42

Г. Н. Бянцков. Влияние реакции среды на интенсивность азотфиксации и рост азотобактера 49

М. А. Мессинева. Биохимические процессы в грязевых вулканах „Ахтанизовские Блевако" 54

М. И. Нахимовская. Pseudomonas aurantiaca nov. sp 58

Н. И. Гамова-Каюкова. Метод получения сухих культур молочнокислых бактерий с применением «ростовых веществ» и сушки в вакууме при низких температурах 66

Г. П. Славнина. Применение флуоресцентного метода для исследования некоторых видов бактерий, окисляющих углеводороды 76

Н. Н. Крицкая. О токсичности среды Вильсон — Блера для анаэробов . . . 82

П. Я. Мизин и Л. И. Воронина. Консервирование клеев антисептиками 87

И. В. Воронкевич. Выживаемость возбудителя слизистого бактериоза капусты Erwinia aroideae (Tows) Holland в почве 91

В. Л. Рыжков и В. А. Смирнова. Влияние катионов на некротическую реакцию у Nicotiana glutinosa 96

Рефераты 100

А00418 Подписано к печати 28. I. 1948 г. 6¼ печ. л.+2 вклейки
Уч.-изд. л. 9,75 Тираж 3000 экз. Зак. 3834

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., 10

Цена 9 руб.